

**Isolierung und Primärstruktur
der Proteolipid-Untereinheit aus dem
ATPase Komplex des Rinderherzens**

Thomas M. Graf

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Isolierung und Primärstruktur
der Proteolipid-Untereinheit aus dem
ATPase Komplex des Rinderherzens

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Thomas M. Graf
aus
Karlsruhe

November 1979



Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. R. Schweyen
Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12. 1979

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 1975 bis August 1978 am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h.c. Theodor Bücher und Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Walter Sebald.

Herrn Prof. Bücher danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Schweyen danke ich für sein Interesse und die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät.

Herrn Dr. E. Wachter danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Aufklärung der Primärstruktur.

Zu großem Dank bin ich Herrn Dr. Walter Sebald verpflichtet. Seine Anregung zu dieser Arbeit und seine Ratschläge während der Durchführung machten mich mit Fragestellung und Bewältigung biochemischer Probleme vertraut. Seine stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung waren mir eine große Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Gaby Hauer, deren geschickte technische Assistenz zum Gelingen der vielfältigen Experimente wesentlich beigetragen hat.

Schließlich sei an dieser Stelle meiner Frau Gertrud gedankt für ihre fachkundige Beratung bei der Zusammenstellung des Manuskriptes und für das Schreiben der Vorlage. Meiner ganzen Familie danke ich von Herzen, deren unermüdliche Unterstützung und Verständnis mir die Durchführung dieser Arbeit entscheidend erleichtert haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG UND PLAN	1
2. ERGEBNISSE	
2.1. Untersuchungen zur Wirkung von DCCD auf ganze Mitochondrien	11
2.1.1. Hemmung der ATPase-Aktivität	11
2.1.2. Bindung von (^{14}C) DCCD an die mitochondriale Membran	13
2.1.3. (^{14}C) DCCD-Radioaktivitätsverteilung in den mitochondrialen Membranen nach gelelektrophoretischer Auftrennung	14
2.2. Die Identifizierung des DCCD-bindenden Proteins als Untereinheit des ATPase Komplexes	17
2.2.1. Der immunpräzipitierte ATPase Komplex	17
2.2.2. Die Anreicherung der OS-ATPase	20
2.3. Isolierung und Charakterisierung des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen	26
2.3.1. Rohextrakt	26
2.3.2. Reinigung des DCCD-bindenden Proteins durch CM-Cellulose Chromatographie	26
2.3.3. Reinheitskriterien	31
2.3.4. Molekulargewicht	33
2.3.5. Aminosäurenanalyse	33
2.4. Isolierung und Charakterisierung des DCCD-bindenden Proteins aus der Rinderleber	37
2.5. Die Primärstruktur des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen	40
2.5.1. Strategie zur Sequenzierung der Polypeptidkette	40
2.5.2. Die Aminosäuresequenz des Proteolipids	41

	Seite
2.5.3. BrCN-Spaltung des DCCD-bindenden Proteins	44
2.5.3.1. Auftrennung der BrCN-Peptide	44
2.5.3.2. Charakterisierung der BrCN-Peptide	47
2.5.3.3. Deutung der proteinchemischen Daten	52
2.5.4. NBS-Spaltung des größten BrCN-Peptids	54
2.5.4.1. Isolierung und Charakterisierung der NBS-Spaltprodukte	55
2.5.4.2. Ausbeute der NBS-Spaltung	60
2.5.5. NBS-Spaltung der vollständigen Peptidkette	62
2.5.6. Bilanz der Spaltergebnisse	63
 3. EXPERIMENTELLER TEIL	
3.1. Präparationen von Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln	68
3.1.1. Rinderherzmitochondrien	68
3.1.2. Rinderlebermitochondrien	68
3.1.3. Submitochondriale Partikel	69
3.2. Markierung mitochondrialer Membranen mit (^{14}C) DCCD	70
3.3. Hemmung der ATPase-Aktivität von Mitochondrien durch DCCD	71
3.4. Anreicherung der OS-ATPase aus Rinderherzmitochondrien	72
3.5. Immunpräzipitation des ATPase Komplexes	74
3.5.1. Herstellung des Antigens	74
3.5.2. Gewinnung des Antiserums	74
3.5.3. Immunpräzipitation	75
3.6. Isolierung des DCCD-bindenden Proteins	76
3.6.1. Rohextrakt	76
3.6.2. CM-Cellulose Chromatographie	76

	Seite
3.7. Biogel P-30 Chromatographie	77
3.8. Spaltungen des DCCD-bindenden Proteins	78
3.8.1. BrCN-Spaltung	78
3.8.2. NBS-Spaltung	78
3.9. Synthese von (^{14}C) DCCD	79
3.10. Proteinchemische Methoden	80
3.10.1. Dünnschichtchromatographie	80
3.10.2. Bestimmung des N-Terminus durch die Dansyl- technik	80
3.10.3. Aminosäurenanalyse	81
3.10.4. Perameisensäureoxidation	81
3.11. Sonstige analytische Methoden	82
3.11.1. Bestimmung der ATPase-Aktivität	82
3.11.2. Radioaktivitätsmessungen	82
3.11.3. Proteinbestimmung	83
3.11.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	83
3.12. Verwendete Materialien	84
4. DISKUSSION	
4.1. Der mitochondriale ATPase Komplex	85
4.2. Die Rolle des DCCD-bindenden Proteins im mitochondrialen ATPase Komplex	85
4.3. Der molekulare Mechanismus des Protonentrans- portes durch Membranen	87
4.3.1. Strukturprinzipien von Kanalproteinen	87
4.3.2. Theorien zum Mechanismus der Protonentrans- lokation durch die Phospholipidschicht von Membranen	88

	Seite
4.4. Die Primärstruktur DCCD-bindender Proteine	89
4.5. Die Bindungsstelle und Reaktionsweise des DCCD	92
4.6. Homologien in den Primärstrukturen der DCCD- bindenden Proteine aus verschiedenen Spezies	96
4.7. Biogenese des DCCD-bindenden Proteins	100
4.8. Die Quartärstruktur des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen	100
4.9. Anreicherung des DCCD-bindenden Proteins	102
4.10. Ausblick	104
5. ZUSAMMENFASSUNG	105
6. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	107
7. LITERATURVERZEICHNIS	109

1. EINLEITUNG UND PLAN

Drei Modelle sind entwickelt worden, die den mechanistischen Ablauf der oxidativen Phosphorylierung auf unterschiedliche Weise beschreiben (1-4). Das von Mitchell postulierte Modell der chemiosmotischen Kopplung (4) ist inzwischen mit viel experimenteller Evidenz untermauert worden (5-10). Es soll hier kurz erläutert werden, denn bestimmte Eigenschaften des in dieser Arbeit ausführlich charakterisierten mitochondrialen ATPase Komplexes können besser verstanden werden, wenn man den Vorgängen um die Energiekonservierung diese Vorstellungen zugrunde legt.

Nach dieser Vorstellung werden energieliefernde (Elektronenfluß) und energieverbrauchende Prozesse (ATP-Synthese) des Mitochondriums durch einen energiereichen Intermediärzustand, nämlich einen elektrochemischen Gradienten aus H^+ -Ionen quer zur inneren Mitochondrienmembran, gekoppelt. Nach Mitchells Postulat kommt den Elektronenüberträgern der Atmungskette die Funktion eines aktiven Transportsystems oder einer "Pumpe" zu, die H^+ -Ionen aus der mitochondrialen Matrix durch die innere Membran hindurch transportiert und damit einen H^+ -Ionengradienten quer zu dieser Membran erzeugt. In einer vektoriellen Reaktion, die den ATPase-Komplex der inneren Membran miteinschließt, wird der H^+ -Ionengradient dann zur Bildung von ATP aus ADP und P_a eingesetzt (10,11).

Obwohl die Rolle der mitochondrialen ATPase in der oxidativen Phosphorylierung die einer ATP-Synthetase ist, kann sie auch in umgekehrter Weise arbeiten. In Mitochondrien ist der Energiefluß zwischen dem Elektronentransfer-Komplex und der ATPase reversibel. Die ATPase kann Energie aus der Hydrolyse von ATP benutzen und den Elektronenfluß umkehren, d.h. Substrat des Atmungskomplexes reduzieren oder Energie-verbrauchende Prozesse wie Transhydrogenierung von Pyridinnukleotiden, Ionentransport gegen den Gradienten etc. ankurbeln. Die mitochondriale ATPase ist in der Lage unter Verbrauch von ATP H^+ -Ionen gegen den elektrochemischen Gradienten durch die hydrophobe Region der Membran zu transportieren und durch Aufbau des energiereichen, elektrochemischen Zustandes Energie zu konservieren (12,13). Sie wird deshalb auch als H^+ -ATPase bezeichnet(12).

Experimentelle Unterstützung für diese Vorstellung findet man vor allem in Arbeiten über rekonstituierte Lipoprotein-Vesikel. In diesen Experimenten wurden Präparationen entweder des gesamten ATPase-Komplexes (10,14) oder Teilstücke von diesem (15) (Membransektor plus OSCP plus F_1 ; Nomenklatur und Morphologie siehe unten), die zuerst getrennt wurden, nacheinander mit Lipiden so rekonstituiert, daß sie Lipoproteinvesikel bildeten, die ein Membranpotential aufbauten, wenn ATP hydrolysiert wurde.

Dieser Prozeß, der auch in Bakterien und Chloroplasten beschrieben ist (Übersichtsartikel siehe Ref. 12,13,16,17), wird durch Antibiotika wie Oligomycin und DCCD verhindert. Beide Verbindungen spielten in ersten experimentellen Anläufen zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung eine wichtige Rolle, weil es gelang, mit ihrem Einsatz die komplexen Vorgänge in Einzelreaktionen zu zerlegen. Schon geringe Konzentrationen von Oligomycin (18) und DCCD (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid) (19,20) genügten, um die gekoppelte Atmung intakter Mitochondrien, nicht aber die substratgebundene Phosphorylierung (21) zu hemmen.

Folgende Befunde verdeutlichen die Wirkungsweise dieser Inhibitoren.

1. Die mitochondriale Innenmembran ist für Protonen impermeabel, durch besondere Vorbehandlung, z.B. Entfernen der F_1 -ATPase, wird die Membran für H^+ -Ionen durchlässig. Oligomycin unterbindet die Passage von Protonen in solchen Membranen (22).
2. Die Protonentranslokation in Proteoliposomen, die Phospholipide und Präparationen des hydrophoben Membransektors des mitochondrialen ATPase-Komplexes enthalten, ist sensitiv für Oligomycin (23).
3. Den gleichen Effekt hat das Carbodiimid (DCCD) auf Membranvesikel aus *E. coli*, die mit chaotropen Reagenzien extrahiert wurden (24). Der passive Protonenfluß durch die Membran einer *E. coli*-Mutante, der die lösliche, Mg^{2+} -abhängige ATPase (F_1) fehlt, wird durch den gleichen Inhibitor stark reduziert (25).

Parallel zu den Bemühungen um die Aufklärung des Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung und die Rolle, die die mitochondriale ATPase

dabei spielt, wurden die Strukturen, die Träger jener Funktionen sind, eingehend erforscht. Die mitochondriale ATPase ist eines der komplexesten Enzyme, die man bis heute kennt. Je nach Betrachtungsweise, ob die Funktion, die Struktur oder die Sensibilität für bestimmte Inhibitoren betont werden soll, wird das Enzym H^+ -ATPase, mitochondrialer ATPase Komplex oder Oligomycin-sensitive (=OS-ATPase) bzw. DCCD-sensitive ATPase genannt.

Der universelle Charakter dieses Enzyms, d.h. die große Ähnlichkeit der bakteriellen Membran-ATPasen (26) mit denen aus Chloroplasten (27) und Mitochondrien (28-30), sowohl aus funktioneller wie aus struktureller Sicht, die Untereinheiten, Molekulargewichte, Aminosäurezusammensetzung, elektronenmikroskopische Bilder und Sensibilität für Inhibitoren einschließt, ist leicht zu verstehen, wenn man seine zentrale Stellung im Stoffwechsel als Energietransformator betrachtet. Offenbar ist das funktionelle System der Energiegewinnung in der eukaryotischen Zelle und in vielen Bakterien eng an strukturelle Voraussetzungen geknüpft, daß sich grundlegende Varianten nicht durchsetzen konnten.

In den folgenden Abschnitten soll die Struktur des mitochondrialen ATPase Komplexes näher beschrieben werden. Eine schematische Zusammenfassung seiner Funktion und Struktur zeigt Abb.1. Das Enzym ist mit der Innenmembran fest verbunden, kann aber mit Hilfe von Detergencien (31-32) oder Salzen von Gallensäuren (33) in aktiver Form solubilisiert werden (Übersichtsartikel:16,28,29). Der Phospholipidgehalt schwankt je nach Isolierungsmethode von 3% (18) bis zu 30% (33). Sein Molekulargewicht beträgt ca. 500 000 (31).

Es wird als gesichert angenommen, daß die mit den oben genannten Methoden isolierte ATPase den gesamten mitochondrialen Komplex umfaßt, der aus drei Teilen besteht:

1. einer wasserlöslichen, oligomycin-insensitiven ATPase, auch Kopplungsfaktor F_1 genannt ,
2. einer Fraktion, die fest mit der Innenmembran assoziiert ist und daher als Membranfaktor bezeichnet wird und
3. einem Protein, das für die Bindung von F_1 an die Membran not-

wendig ist, wodurch die ATPase wieder für Oligomycin sensitiv wird; diese Eigenschaft gab ihm den Namen OSCP (Oligomycin-sensitivity conferring protein).

F₁-ATPase:

In einer heute klassischen Schrift berichtet Pullman et al. 1960 (34) von einer wasserlöslichen ATPase, isoliert und angereichert aus Rinderherzmitochondrien, die -wieder an die Membran gebunden- die oxidative Phosphorylierung stimulierte (35). Die F₁-ATPase wurde inzwischen aus vielen verschiedenartigen Geweben und Organismen isoliert und gehört zu den am besten untersuchten ATPasen überhaupt. Das Enzym hat ein Molekulargewicht von ca. 360 000 Dalton, ist im Gegensatz zu dem gesamten Komplex kältelabil und seine ATPase-Aktivität insensitive gegenüber Inhibitoren wie Oligomycin, DCCD und Quecksilberverbindungen (34,35). Es existieren erste Berichte über die kristalline Darstellung der Enzyme aus dem Rinderherzen (36) und aus dem thermophilen Bakterium (37). Die Kristalle konnten mit Hilfe der Röntgenstrahlenkristallographie analysiert werden (17).

Die F₁-ATPase ist identisch mit den kleinen Köpfchen von 90 Å Durchmesser (38), die man auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sehen kann, wenn Innenmembranen oder OS-ATPasen nach dem negativ-staining Verfahren (39) bzw. der Gefrier-Ätz-Technik (40) dargestellt wurden.

Die Quartärstruktur des F₁ zeigt große Übereinstimmung in zahlreichen Spezies. Der Proteinkomplex besteht aus fünf unterschiedlich großen Untereinheiten (α , β , γ , δ , ϵ), deren Molekulargewichte von 60 000 bis 8 000 reichen. Die beiden größten Untereinheiten α (ca. 55 000) und β (ca. 52 000) machen über 90% des gesamten Proteins aus. Man diskutiert eine hexagonale Anordnung dieser Untereinheiten (17,28,29).

Die Stöchiometrie der Untereinheiten ist noch nicht restlos aufgeklärt, da Enzyme von manchen Spezies zu einer Teildissoziation neigen (41), doch scheinen die Zahlverhältnisse von 3:3:1:1:1 (α : β : γ : δ : ϵ) experimentell am fundiertesten zu sein (17).

Bindungsstudien mit Aurovertin (41) und Rekonstitutionsversuche aus isolierten Untereinheiten (17) aus dem thermophilen Bakterium PS3 legen den Schluß nahe, daß die Untereinheit β das katalytische Zentrum der ATP-Hydrolyse trägt.

Ebenfalls durch Rekonstitutionsexperimente kamen Yoshida (42) und Mitarbeiter zu der Ansicht, daß $\gamma + \delta + \epsilon$ ein Ventil für Protonen in der H^+ -ATPase bilden; δ und ϵ sind vermutlich an der Bindung von F_1 an dem Membransektor beteiligt. ATP- P_a Austausch wird nur am vollständig rekonstituierten, vesikulären Komplex (F_1 plus Membransektor) beobachtet.

Ein kleines Protein (MW 10 000), das "spezifischer mitochondrialer ATPase-Inhibitor" genannt wird (43), wird im allgemeinen als weitere Untereinheit dem F_1 zugezählt. Es hemmt spezifisch mitochondriale ATPasen. Während der Isolierung der F_1 -ATPase wird das Protein, abhängig von der Prozedur, teilweise oder ganz entfernt.

OSCP

Dieses Protein (MW 18 000) wurde aus Rinderherzmitochondrien und aus Rinderherz OS-ATPase isoliert (44). Frühere Untersuchungen über die Funktion beschrieben vor allem die Tatsache, daß das Protein zur Wiederherstellung der Oligomycinsensitivität gebraucht wurde (20). Diese Fähigkeit gab ihm seinen Namen. Inzwischen ist jedoch bekannt, daß das OSCP Oligomycin nicht bindet, sondern eher im Zusammenhang mit der Bindung von F_1 an den Membranteil des ATPase Komplexes gesehen werden muß (45,46).

Die Aminosäurezusammensetzung von mehreren F_1 -ATPasen, von deren fünf Untereinheiten, des Inhibitors und des OSCP ist bekannt (Übersicht: Ref. 29). Die Analysen zeigen starke Ähnlichkeiten untereinander. In den Untereinheiten α , β , δ ist der saure Charakter, in γ und ϵ der basische Charakter erwähnenswert.

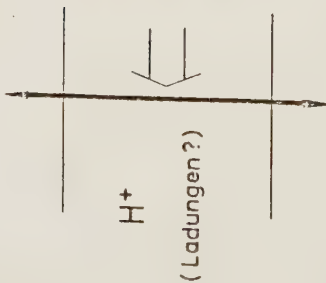
Membranfaktor

Wenn man die OS-ATPase mit chaotropen Reagenzien behandelt, kann dadurch der F_1 -Anteil extrahiert werden. Weitere Behandlung mit Alkali trennt das OSCP vom restlichen Teil des Komplexes ab (46). Dieser Teil ist ein wasserunlösliches Lipoprotein, der sogenannte Membranfaktor, der sich mit OSCP und F_1 zum vollständigen Komplex rekonstituieren läßt. Er ist aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt, deren Zahl mit zwei bis vier angegeben wird (30,47,48). Eine davon (Untereinheit 9 der Hefe-ATPase) konnte isoliert werden (47). Die Aminosäurezusammensetzung hat ungewöhnlichen Charakter.

ATPase KOMPLEX

(Mitochondrien)

Energieübertragendes Enzym



Untereinheiten
(Dalton)

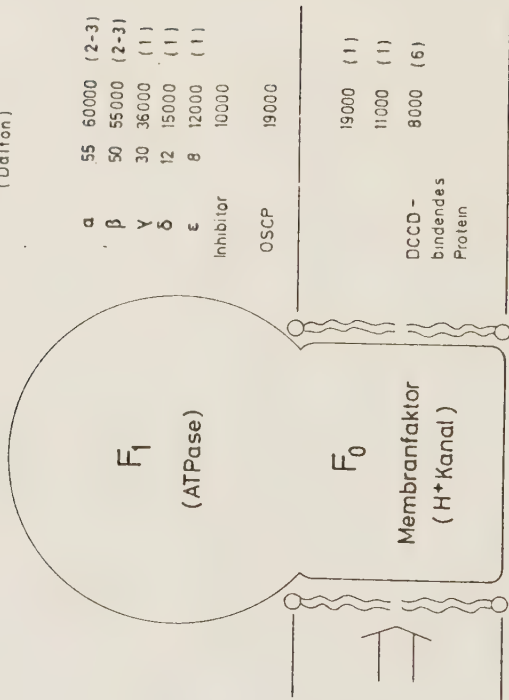


Abb. 1 Schematische Darstellung des mitochondrialen ATPase Komplexes

Der mitochondriale ATPase Komplex hat zwei Aufgaben, die im membranintegrierten Enzym gekoppelt sind:

- 1) die Hydrolyse oder Synthese von ATP
- 2) den Transport von Protonen durch die Membran

Der Transport, ebenso wie die katalytische Aktivität des Gesamtkomplexes, wird durch Oligomycin und DCCD gehemmt. Träger der ATPase- (bzw. ATP-Synthetase) Aktivität ist der F_1 -Anteil. Er besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten, deren Molekulargewichte zwischen 60 000 und 8 000 Dalton liegen, und einem spezifischen Inhibitor mitochondrialer ATPasen. Die beiden größten Untereinheiten liegen in einem stöchiometrischen Verhältnis von (2-3) : 1 im Vergleich zu den kleinen Untereinheiten vor.

Zur Fixierung von F_1 an den Membranteil ist das sogenannte OSCP notwendig.

Der Membranfaktor, dem die Eigenschaft eines H^+ -Kanals zukommt, ist aus mindestens zwei Arten von Untereinheiten zusammengesetzt, darunter das DCCD-bindende Protein, das im Komplex als Oligomer (vermutlich als Hexamer) vorliegt.

Der Anteil der hydrophoben Aminosäuren ist extrem groß.

So zahlreich und auf die vielfältigste Weise belegt die Daten über die wasserlöslichen Anteile des ATPase Komplexes sind, so wenig ist über den membranintegrierten Teil bekannt. Racker (23) war der erste, der den Hinweis gab, daß der Einbau einer hydrophoben Membrankomponente der OS-ATPase in die Membran von Liposomen die Durchlässigkeit von Protonen durch diese Membran induzierte. Andere Gruppen (22,49) haben bestätigt, daß dem Membranfaktor die Eigenschaft eines H^+ -Kanals zukommt.

Schon früh wurde die Angriffsstelle des DCCD im membranintegrierten Sektor des Enzyms lokalisiert (19,50). Gestützt wurde dieser Befund durch die Beobachtung, daß die F_1 -ATPase Rutamycin (=Oligomycin A) nicht bindet, die Behandlung des Membransektors (und OSCP) jedoch zur Bindung dieses Antibiotikums führt (51). Catell et al. (52) reicherten ein Peptid mit dem Molekulargewicht von ca. 10 000 Dalton an, das irreversibel das radioaktiv markierte DCCD gebunden hatte. Dieses Peptid wurde als Bestandteil des mitochondrialen ATPase Komplexes identifiziert (53). Unter Verwendung von "spin-labelled" DCCD und einem Mangan-Komplex des ATP zeigten Azzi et al. (54), daß in submitochondrialen Partikeln die Bindungsstelle des DCCD im ATPase Komplex etwa 20 Å von der ATP-Bindungsstelle entfernt ist.

Obwohl eine Präparation dieses DCCD-bindenden Proteins schon relativ früh beschrieben wurde und seine Bedeutung im Zusammenhang mit der oxidativen Phosphorylierung offenkundig war, konnten keine weiteren Daten über Struktur und Funktion gewonnen werden. Erst in jüngster Zeit hat man die Handhabung solch extrem hydrophober Peptide durch Anwendung organischer Lösungsmittel wie Chloroform und Methanol in den Griff bekommen. Die lange Reihe von Veröffentlichungen über die Isolierung und Charakterisierung von DCCD-bindenden Proteinen an den verschiedensten Organismen spiegelt das breite Interesse wieder, das diesem Protein seit einiger Zeit geschenkt wird (47,49,52,53,55-63). Die Aufklärung seiner Struktur, im Zusammenhang mit seiner möglichen Rolle als Protonophor, könnte ein weiterer Schritt zur Aufklärung des Mechanismus der Atmungskettenphosphorylierung sein.

Es ist gelungen, die isolierte Untereinheit in eine Lipidmembran zu

rekonstituieren, und eine protonenübertragende Aktivität, die sensitiv für DCCD und Oligomycin ist, zu messen (59,64). Diese Hinweise deuten an, daß das DCCD-bindende Protein das strukturelle Substrat des Protonenkanals ist.

Die bisher bekannten DCCD-bindenden Proteine haben eine Reihe von gemeinsamen Merkmalen:

Wegen ihrer Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln werden sie als Proteolipide (65) bezeichnet.

Sie besitzen ein Molekulargewicht von ca. 8 000 Dalton und bilden im ATPase Komplex ein Oligomer, vermutlich ein Hexamer. Ihr extrem hydrophober Charakter wird in der Zusammensetzung ihrer Aminosäuren nochmals deutlich.

Von den Peptiden aus Neurospora crassa, Hefe und E.coli ist die Aminosäuresequenz bestimmt worden (66). Die DCCD-bindende Gruppe konnte identifiziert werden (66) und Aminosäureaustausche in oligomycinresistenten Mutanten der Hefe (62) und Neurospora crassa (67) gefunden werden.

In diesem Rahmen entstand die vorliegende Arbeit. Das DCCD-bindende Protein aus Rinderherzmitochondrien war zwar das erste, deren Isolierung beschrieben wurde. Doch sind Zweifel angebracht, daß der Reinheitsgrad dieser Präparation weitere Studien an diesem Protein erlaubte. So blieben weiterführende Arbeiten aus. Die Fortschritte in der Aufklärung der Primärstruktur der DCCD-bindenden Proteine aus Neurospora crassa und Hefe, ebenso wie die Entwicklung über den funktionellen Charakter führten zur Ausarbeitung einer Methode, die es erlaubt, ein Protein aus einem höheren Organismus zu isolieren und zu charakterisieren, und die Primärstruktur dieses Proteins mit den bereits bekannten zu vergleichen, um so die generellen und typischen Züge der Aminosäuresequenz herausheben und die während der Evolution konservierte Sequenz im Hinblick auf Funktion und Struktur als Protonophor analysieren zu können. Um die Spannungsbreite im phylogenetischen Sinne groß zu halten, wurde im Gegensatz zu den bereits sich im Gange befindlichen Untersuchungen über die bakteriellen bzw. mitochondrialen Proteine aus Pilzen - für diese Zwecke ein

hochentwickelter Organismus gewählt.

Die Wahl fiel auf den Herzmuskel des Rindes, der auf dem Gebiet der Mitochondrienforschung wegen der relativ leichten Zugänglichkeit und des hohen Gehaltes an diesem Organell eine lange Tradition besitzt. Diese reicht von Studien über die Gesamtstruktur bis zu detailliertem Wissen über Struktur und Funktion einzelner, molekularer Komponenten wie der Atmungskette, Carriersysteme, Citratsäurezyklus und vieler mehr. Auch der mitochondriale ATPase Komplex stand und steht weiterhin im Brennpunkt des Interesses. Die vollständige Auflösung seiner komplexen Struktur und die Zuordnung der Teilfunktionen zu diesen Strukturen ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung, wobei das Enzym aus Rinderherzmitochondrien eine bedeutende Rolle spielt (68-72). So erschien es sinnvoll, das DCCD-bindende Protein, das ja eine Untereinheit dieses Komplexes darstellt, zu isolieren und charakterisieren.

2. ERGEBNISSE

2.1. Untersuchungen zur Wirkung von DCCD auf ganze Mitochondrien

Die inhibitorische Wirkung des DCCD auf die oxidative Phosphorylierung war die erste Beobachtung, die das Interesse auf diese Verbindung lenkte (20,50). Beechey et al. zeigte, daß 2 nMol/mg Mitochondrienprotein genügte, um die gekoppelte Atmung in intakten Rinderherzmitochondrien praktisch vollständig zu hemmen. In einem Experiment, das Stekhoven et al. beschrieb (53), reichten 5-6 nMol DCCD aus, um die ATPase-Aktivität des isolierten ATPase Komplexes zu unterbinden. Die hier gemessenen Werte (2-3 nMol DCCD/mg Mitochondrienprotein zur vollständigen Hemmung der ATPase-Aktivität) liegen in der gleichen Größenordnung. DCCD ist aber nicht nur ein spezifischer Hemmstoff der mitochondrialen ATPase-Aktivität, er wird darüberhinaus irreversibel gebunden. Dadurch konnte mit Hilfe von (^{14}C) markiertem DCCD das DCCD-bindende Protein identifiziert und während der Anreicherung verfolgt werden.

Zunächst war es aber notwendig, abzuklären, unter welchen Bedingungen die ATPase gehemmt wird und wieviel DCCD mit welcher Spezifität gebunden wird. Ursprünglich wurden von Beechey lange Inkubationszeiten (16-20 h) angewendet, wobei eine Hemmung mit ungefähr stöchiometrischen DCCD-Mengen (in Bezug auf den Enzymkomplex) erreicht wurde. Bei unseren Versuchen wurde eine Inkubationszeit von 4 h im Eisbad gewählt. Unter diesen Bedingungen wurde auch die Hemmung an Mitochondrien anderer Organismen durchgeführt und so konnte die Reaktivität direkt verglichen werden.

2.1.1. Hemmung der ATPase-Aktivität

Der inhibitorische Effekt verschiedener DCCD-Konzentrationen auf die ATPase-Aktivität der Mitochondrien aus dem Rinderherz wird in Abb. 2 gezeigt. Halbmaximale Hemmung wird bei 0,4-0,5 nMol DCCD pro mg Protein erreicht; bei 2-3 nMol/mg Protein ist die ATPase zu 100% gehemmt. Bemerkenswert ist, daß Mitochondrien aus anderen Organismen (*Neurospora* und Hefe) erst bei deutlich höheren Konzentrationen gehemmt werden (55).

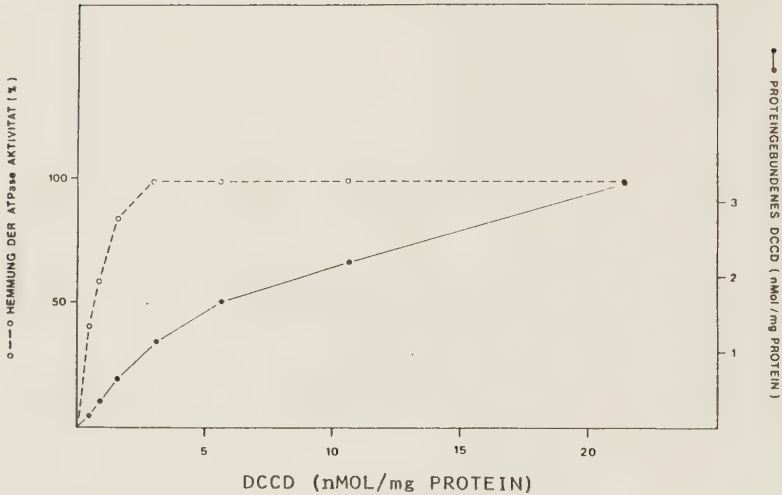


Abb. 2 Wirkung von (14 C) DCCD auf Mitochondrien aus dem Rinderherzen

1) Hemmung der ATPase-Aktivität

Mitochondrien aus dem Rinderherzen wurden bei steigenden Konzentrationen mit (14 C) DCCD bei 0 °C inkubiert, wie unter 3.3. beschrieben. Den inhibitorischen Effekt des Carbodiimids auf die ATPase-Aktivität zeigt die gestrichelte Linie des Diagramms. Die Abszisse gibt die Inhibitor-konzentrationen, bezogen auf mitochondriales Protein, im Inkubationsgemisch an. An der Ordinate kann die Hemmung der ATPase-Aktivität abgelesen werden; dazu wurde die Aktivität aus dem Ansatz ohne DCCD gleich 100% gesetzt.

2) Bindung von (14 C) DCCD an die mitochondriale Membran
Im selben Experiment wurde ein Aliquot eines jeden Ansatzes intensiv mit organischen Lösungsmitteln gewaschen (siehe 3.2.), getrocknet und in 2% SDS gelöst. Danach wurden von jeder Probe der Radioaktivitätsgehalt und die Proteinkonzentration, aus denen sich der spezifische DCCD-Gehalt (nMolDCCD/mg mitoch. Protein) berechnen ließ, bestimmt. Die Abhängigkeit dieses Wertes von der Inhibitor-konzentration im Ansatz zeigt die zweite Kurve des Diagramms (●-●).

2.1.2. Bindung von (^{14}C) DCCD an die mitochondriale Membran

Die Bindung von DCCD an die mitochondriale Membran wurde mit Hilfe des (^{14}C) markierten Inhibitors, der aus (^{14}C) Harnstoff synthetisiert wurde (20 mCi/mMol), untersucht. Dazu wurden die Mitochondrien mit steigenden Konzentrationen an (^{14}C) DCCD inkubiert und anschließend gründlich mit organischen Lösungsmitteln gewaschen, um nicht gebundenes DCCD zu entfernen. Bei der angewendeten Methode wurden zwar Lipide und Wasser, jedoch nicht das Proteolipid extrahiert. Etwa 37% der eingesetzten Radioaktivität wurde gebunden bei einer Inhibitorkonzentration, die gerade ausreicht, um die ATPase maximal zu hemmen (Abb. 2). Die spezifischen Markierungswerte steigen aber mit steigenden Carbodiimidkonzentrationen weiter an und nähern sich einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (DCCD:Peptid), obwohl die maximale Hemmung der ATPase-Aktivität schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen erreicht war.

In den hier beschriebenen Konzentrationsbereichen des Bindungs-Hemm-diagramms kann keine eindeutige, gesetzmäßige Beziehung zwischen Hemmung und Bindung beobachtet werden. Bezieht man das gebundene Carbodiimid auf das DCCD-bindende Protein selbst, läßt sich - geht man von bestimmten molaren Verhältnissen in der mitochondrialen Innenmembran aus - eine Stöchiometrie von 1:3 (Mol DCCD/Mol Peptid) bei maximaler Hemmung kalkulieren. Berücksichtigt man die Tatsache, daß das DCCD-bindende Protein als Oligomer (Hexamer?) vorliegt und die Markierung dieser Oligomeren wahrscheinlich statistisch erfolgt, so ist denkbar, daß - bezogen auf ein Oligomer - ein Molekül DCCD zur Hemmung ausreicht. Dies könnte bei sehr niedrigen Carbodiimidkonzentrationen der Fall sein, wo nur 1/6 des Proteins markiert ist; dabei muß die Restaktivität der ATPase unberücksichtigt bleiben. Die kovalente Bindung des DCCD an das Proteolipid kann also die Hemmwirkung allein erklären; eine zusätzliche Reaktion ist dazu nicht notwendig.

Die Verhältnisse bei Neurospora crassa und bei Hefe unterscheiden sich deutlich von den oben beschriebenen. Die Reaktivität dieser Membranen ist wesentlich schwächer. Deshalb sind höhere Konzentrationen zur maximalen Hemmung notwendig und weniger DCCD ist gebunden.

Welche Gründe dafür ausschlaggebend sind, denkbar wären geringe Konformationsunterschiede, Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder die Membranlipidkomponente, ist nicht bekannt.

2.1.3. (^{14}C) DCCD Radioaktivitätsverteilung in den mitochondrialen Membranen nach gelelektrophoretischer Auftrennung

Ganze Mitochondrien wurden bei einer Inhibitorkonzentration von 2,5 nMol/mg Protein mit (^{14}C) DCCD markiert. Nach Auftrennung der Proteine mit Hilfe der Gelelektrophorese in Gegenwart von Phenol/Ameisensäure (73) findet man die Radioaktivität ausschließlich in einer Bande (Abb. 4 A). Um die scheinbaren Molekulargewichte unter diesen Bedingungen besser abschätzen zu können, wurde ein Eichlauf mit Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts durchgeführt (Abb.3). Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit des DCCD-bindenden Proteins erscheint ungewöhnlich niedrig, sie ist vergleichbar mit der Laufgeschwindigkeit der β -Untereinheit der F_1 -ATPase (55 000 Dalton). Daten aus der Molekularsiebgelchromatographie lassen aber auf ein Molekulargewicht von 8 000 Dalton schließen. Das Verhalten während der Elektrophorese kann mit dem außerordentlich niedrigen Gehalt an basischen Aminosäuren erklärt werden.

Trennt man die gleichen, markierten Membranen in der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 4 B), erscheinen mehrere Polypeptid-Fraktionen. Diese Radioaktivitätsgipfel sind auch dann zu beobachten, wenn die Membranen bei niedrigeren Konzentrationen, als für maximale Hemmung es notwendig ist, inkubiert werden. In allen Fällen läßt sich der Hauptteil der Radioaktivität einem Peptid mit dem Molekulargewicht von 14 000 Dalton zuordnen; dazu treten weitere markierte Produkte mit Molekulargewichten von 55 000 und 8 000 Dalton auf. Diese Fraktionen scheinen Aggregate eines einzigen, markierten Polypeptids zu sein, denn unter sauren Bedingungen findet man nur eine Radioaktivitätsbande nach der Gelelektrophorese (Abb. 4A).

Im Gegensatz dazu wandern DCCD-bindende Proteine aus anderen Spezies im SDS-Gel als einzelne Bande, die einem scheinbaren Molekulargewicht von 8 000 Dalton entspricht (57-61).

Wie unter 2.2.2. beschrieben, tritt in der isolierten ATPase nur die Fraktion mit dem Molekulargewicht 14 000 auf. Diese Beobachtung

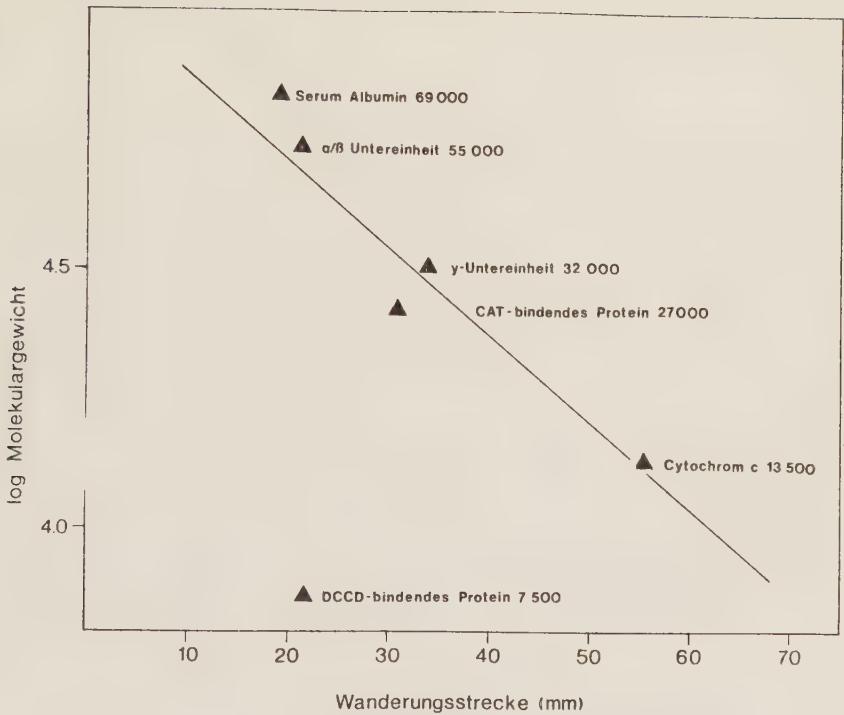


Abb. 3 *Wanderungsgeschwindigkeiten verschiedener Proteine in der Phenol/Ameisensäure - Gelelektrophorese*

Serum Albumin vom Rind (1mg/ml), F_1 -ATPase aus dem Rinderherzen (2 mg/ml), CAT-bindendes Protein aus *Neurospora crassa*, Cytochrom *c* aus Pferdeherz und das DCCD-bindende Protein (Rinderherz) (2 mg/ml) wurden in Phenol/Ameisensäure/Wasser (2:1:1; w:v:v) gelöst und 0,03 ml Aliquots der Gelelektrophorese (10% Acrylamid) unterworfen. Danach wurde das Gel mit Coomassie Blue gefärbt, anschließend entfärbt, wie im experimentellen Teil beschrieben ist. Das Diagramm zeigt die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Proteinfraktionen von ihrem Molekulargewicht.

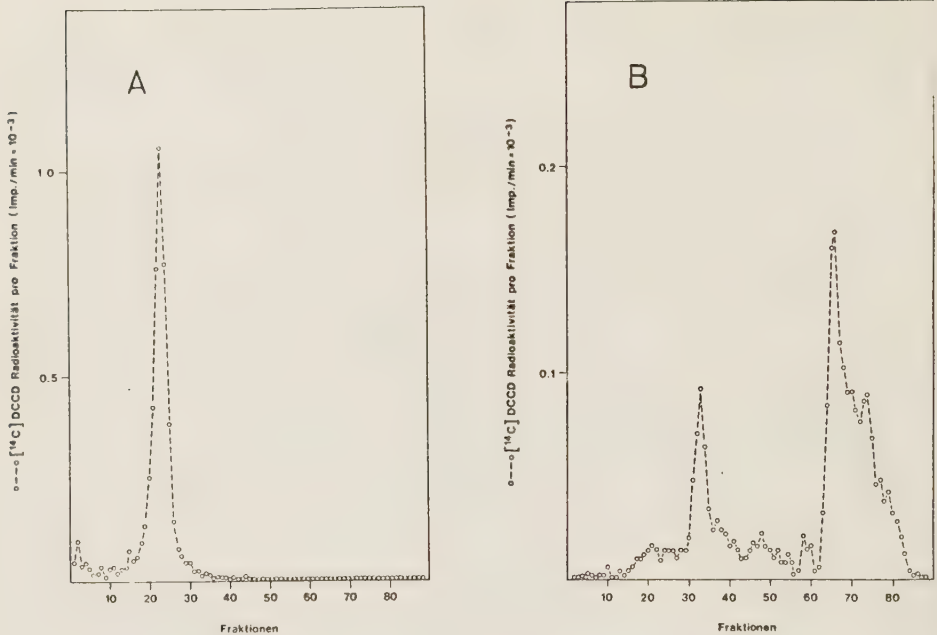


Abb. 4 Verteilung proteingebundener (^{14}C) DCCD - Radioaktivität in submitochondrialen Partikeln nach Phenol/Ameisensäure - Gelelektrophorese (A) und SDS-Gelelektrophorese (B)

Submitochondriale Partikel ($p=15$) wurden bei einer (^{14}C) DCCD Konzentration von 2,4 nMol/mg Protein 4 h bei 0°C inkubiert, mit organischen Lösungsmitteln (Äther/Chloroform/Methanol 15:2:1) fünfmal gewaschen. Aliquots der getrockneten Proben wurden einmal in Phenol/Ameisensäure/Wasser (2:1:1) gelöst ($p=8.6$, 22 400 cpm/mg Protein) und 0,03 ml auf die Gelplatte aufgetragen. Eine zweite Probe wurde in 2% SDS, 0,1 M Trisbase, 5% Mercaptoäthanol gelöst ($p=10$, 22 400 cpm/mg Protein) und 0,02 ml mit Hilfe der Gelelektrophorese analysiert.

Radioaktivität wurde in einem Tricarb-Szintillationszähler bestimmt, wie im experimentellen Teil beschrieben.

wurde bereits von Stekhoven et al. (53) beschrieben.

2.2. Die Identifizierung des DCCD-bindenden Proteins als Untereinheit des ATPase Komplexes

Wenn das gebundene DCCD für die Hemmung des ATPase Komplexes verantwortlich ist, sollte man erwarten, daß das DCCD-bindende Protein, das zunächst als Bestandteil der mitochondrialen Innenmembran nachgewiesen wurde, eine Untereinheit des Enzymproteins bildet. Dies wurde auch von Stekhoven et al. (53) beschrieben. Die Assoziation des DCCD-bindenden Proteins mit dem ATPase Komplex wurde jedoch in den folgenden Experimenten noch einmal untersucht, da (1) verschiedene Molekulargewichte für die DCCD-bindende Untereinheit der ATPase und für die (^{14}C) DCCD-markierten Proteine in ganzen Mitochondrien beschrieben worden sind, (2) (^{14}C) DCCD von niedriger, spezifischer Radioaktivität verwendet worden ist, was zu einer starken Überladung bei der gelelektrophoretischen Trennung zwang und (3) der untersuchte ATPase Komplex stark verunreinigt war, was an dem komplexen Bandenmuster der Präparation ersichtlich ist.

Zwei Prinzipien sind angewendet worden, den ATPase Komplex aus (^{14}C) DCCD-markierten Membranen zu isolieren:

- (1) Immunpräzipitation
- (2) Anreicherung in Gegenwart von Detergentien

2.2.1. Der immunpräzipitierte ATPase Komplex

Das Immunpräzipitat wurde aus Triton X-100 solubilisierten Mitochondrienmembranen mit Hilfe von Antiserum gegen Rinderherz F_1 -ATPase gewonnen. Die Membranen wurden zuvor mit (^{14}C) DCCD (2,5 nMol/mg Protein) markiert. Unter den beschriebenen Bedingungen wurde 30-35% der gebundenen (^{14}C)-Radioaktivität gefällt. Im elektrophoretisch aufgetrennten Immunkomplex läuft die (^{14}C) DCCD-Markierung als ein scharfer Gipfel (Abb. 5). Bemerkenswert ist, daß ihm keine Peptidbande im Coomassie Blue angefärbten Gel zugeordnet werden kann. Vermutlich neigt das DCCD-modifizierte Proteolipid in Dodecylsulfat zur Dimerisierung, da proteinchemische Analysen zeigen (2.3.3.2.), daß das Protein ein Molekulargewicht von etwa 8 000 Dalton hat,

obwohl es aufgrund seiner Laufgeschwindigkeit im SDS-Gel ein Molekulargewicht von 14 000 Dalton haben müßte.

Die DCCD-bindenden Proteine aus Neurospora und Hefe zeigen ein anderes Verhalten. Nach SDS-Gelelektrophorese der immunpräzipitierten ATPase läuft die (^{14}C) DCCD-Markierung zusammen mit der kleinsten Untereinheit des Komplexes (55).

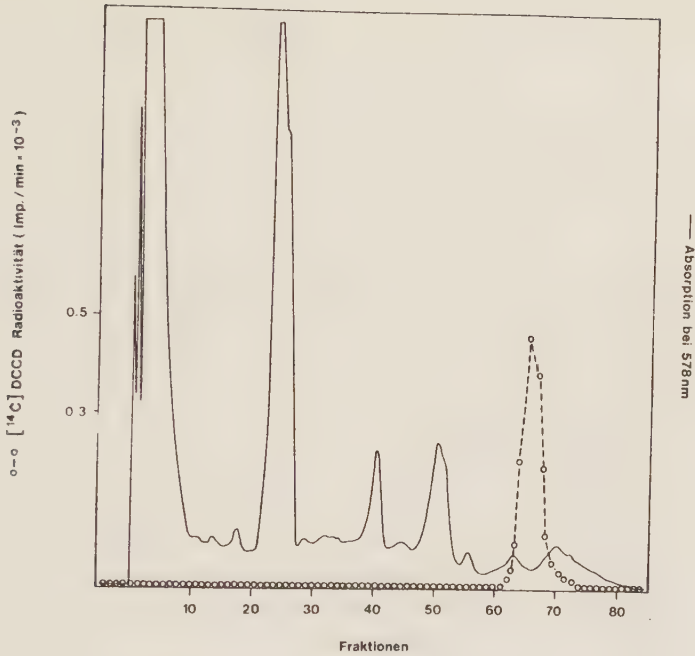


Abb. 5 Polypeptidmuster des ATPase-Komplexes aus dem Rinderherzen, der mit Antiserum gegen F_1 aus solubilisierten SMP immunpräzipitiert wurde, die zuvor mit (^{14}C) DCCD (2,5 nMol/mg Protein) inkubiert worden waren (4 h, 0°C). Der Immunkomplex wurde in 5% SDS, 0,1 M Trisazetat pH 8,5 gelöst und zwei Proben parallel durch Dodecylsulfat-Gelelektrophorese analysiert. Eine Probe wurde mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt, von der anderen die (^{14}C)-Radioaktivität bestimmt. Methodische Einzelheiten sind im experimentellen Teil beschrieben.

— Densitogramm des mit Coomassie Brilliant Blue angefärbten Proteins

o--o (^{14}C) DCCD Radioaktivität

2.2.2. Die Anreicherung der OS-ATPase

Aus submitochondrialen Partikeln wurde die oligomycinsensitive ATPase nach Tzagoloff isoliert (33).

Während der Reinigung wurde die spezifische Enzymaktivität 3-4fach angereichert. Das gereinigte Enzym (Abb. 6 und 7) hatte eine spezifische Aktivität von 8-9 Units/mg und war zu 94% mit Oligomycin hemmbar (Tabelle 1).

In einem weiteren Experiment wurden die Partikel vor Isolierung des Enzyms mit (^{14}C) DCCD markiert (2,5 nMol/mg Protein). Unter diesen Bedingungen wurden 1 nMol DCCD pro mg Protein gebunden. Die spezifische (^{14}C) DCCD Radioaktivität wurde während der Reinigung vierfach angereichert (Tabelle 1).

Wenn man davon ausgeht, daß das Molekulargewicht der OS-ATPase etwa 500 000 Dalton beträgt, läßt sich ein DCCD-Gehalt von 2Mol DCCD pro Mol ATPase errechnen. Der spezifische DCCD-Gehalt des isolierten Proteolipids ist im Vergleich zu der ATPase zehnfach angereichert worden. Läge das Peptid in einem molaren Verhältnis von 1:1 zur ATPase vor, müßte es ein Molekulargewicht von ca. 50 000 Dalton haben. Das Molekulargewicht des DCCD-bindenden Proteins liegt aber bei 7 500 bis 8 000 Dalton. Es müssen deshalb 6-7 Moleküle des Proteolipids pro Mol ATPase angenommen werden, um die Anreicherungsdaten befriedigend erklären zu können. Die Vermutung, daß das Proteolipid als Hexamer vorliegt, wird durch exakte Berechnungen mit internem Proteinstandard bei *Neurospora* und Hefe unterstützt (55).

T A B E L L E 1

Anreicherung der oligomycinsensitiven ATPase aus Rinderherzmitchondrien

Die oligomycinsensitive ATPase wurde aus submitchondrialen Partikeln nach Tzagoloff (33) angereichert. Einmal war das Ausgangsmaterial (SMP) unbehandelt - in diesem Anreicherungs-gang konnte die ATPase-Aktivität bestimmt werden, dann wurde der Enzymkomplex aus submitchondrialen Partikeln isoliert, die vorher mit ^{14}C DCCD ($2,5 \text{ nMol/mg Protein}$) markiert wurden. Diese Anreicherung lieferte die Daten für proteingebundene ^{14}C DCCD - Radioaktivität.

Protein mg	Aktivität Units	spez. Aktivität U / mg
1 900	4 825 (100)	2,5
1 260	3 412 (70)	2,7
504	2 198 (52)	4,4
200	1 394 (29)	7,0
66	594 (12)	9,0
35	276 (5,7)	7,9

Protein mg	^{14}C Radioaktivität cpm $\times 10^5$	spez. Radioaktivität cpm / mg
1 900	52,8 (100)	22 000
750	33,3 (63)	44 500
413	16,4 (31)	40 000
133	8,2 (16)	62 000
120	6,5 (12)	54 000
39	3,5 (6,6)	90 000
8	0,43 (0,8)	54 000
0,8	0,06 (0,1)	76 000

Submitchondriale Partikel

D O C / K C I Oberstand

Oberstand nach Dialyse

Sephadex G-25 Chromatographie

25 % Ammoniumsulfatfällung
nachgereinigte Fraktion

42 % Ammoniumsulfatfällung und
Sephadex G-25 Chromatographie
nachgereinigte Fraktion

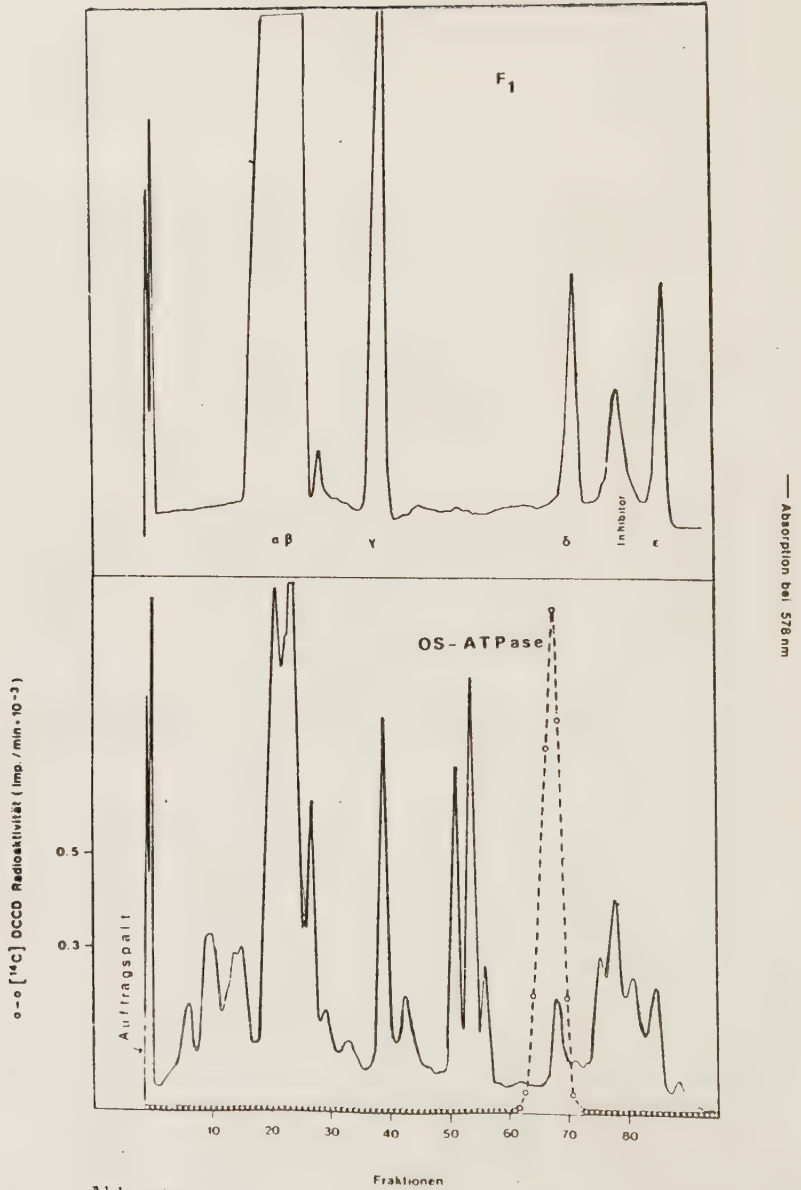


Abb. 6

Abb. 6 Identifizierung des DCCD-bindenden Proteins als Bestandteil des mitochondrialen ATPase Komplexes aus dem Rinderherzen

Die oligomycinsensitive ATPase wurde aus submitochondrialen Partikeln, die zuvor mit (^{14}C) DCCD (2.5 nMol/mg Protein) inkubiert worden waren, nach Tzagoloff (33) präpariert. Aliquots (je 0,06 mg, 90×10^3 cpm/mg) wurden in 2% SDS, 0,1 M Trisbase, 5% Mercaptoäthanol gelöst und in der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese parallel analysiert. Eine Probe wurde mit Coomassie Brillant Blue angefärbt, von der anderen Probe wurde die (^{14}C) DCCD - Radioaktivität bestimmt, wie im experimentellen Teil beschrieben.

— Densitogramm des gefärbten Proteins
o--o (^{14}C) Radioaktivität

Der obere Teil des Diagramms zeigt die Auftrennung der F_1 -ATPase in ihre Untereinheiten. Das Enzym aus dem Rinderherzen wurde nach Seballd & Wild (74) präpariert. 0,04 mg des Enzymproteins wurde in 0,02 ml 2% SDS, 0,1 M Trisbase, 5% Mercaptoäthanol gelöst und parallel zu der OS-ATPase auf die Gelplatte aufgetragen.

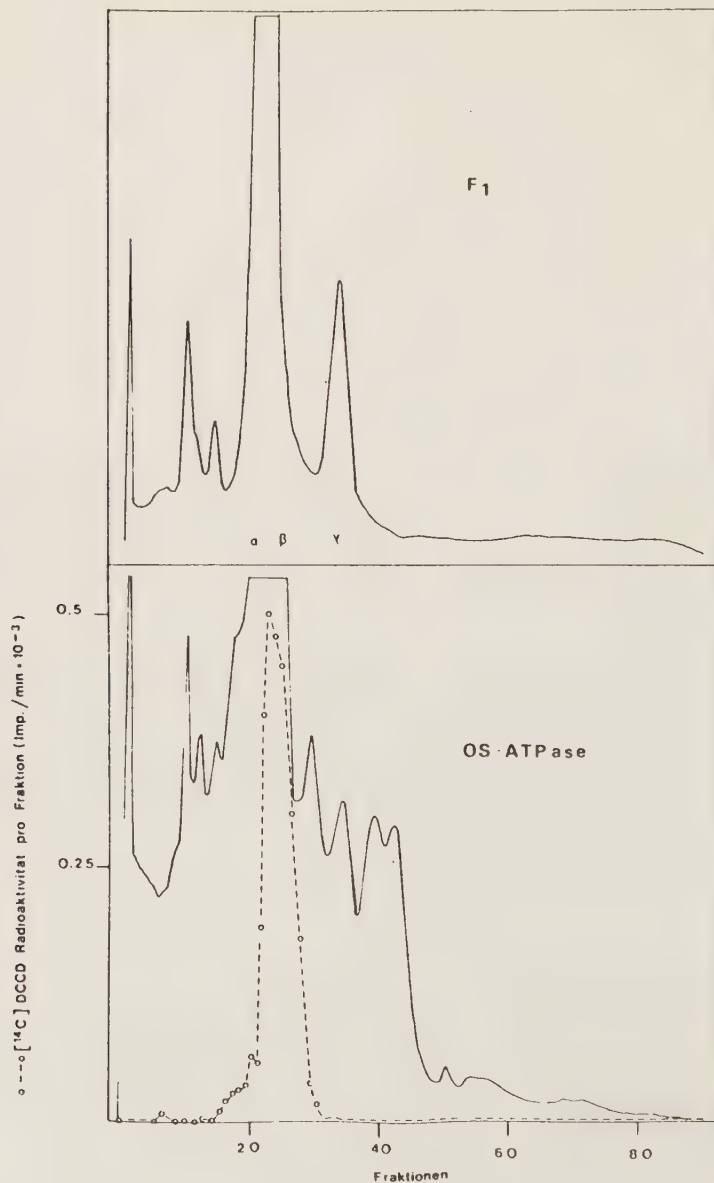


Abb. 7

Abb. 7 Phenol/Ameisensäure - Gelelektrophorese der OS-ATPase aus Rinderherzmitochondrien

Der Enzymkomplex wurde aus SMP, die zuvor mit (^{14}C) DCCD (2,5 nMol/mg Protein) inkubiert worden waren, isoliert. 0,06 mg Protein (76×10^3 cpm/mg) wurden in 0,03 ml Phenol/Ameisensäure/Wasser (2:1:1; w:v:v) gelöst und die Polypeptid-untereinheiten in der Gelelektrophorese (10% Acrylamid) getrennt. Danach wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, anschließend entfärbt, wie unter 3.11.4. beschrieben.

Parallel wurde die F_1 -ATPase, die aus Rinderherzmitochondrien isoliert wurde, in gleicher Weise analysiert.

Methodische Einzelheiten der Radioaktivitätsbestimmung sind unter 3.11.2. beschrieben.

Die Abbildung zeigt das Densitogramm bei 578 nm (—) und die Verteilung der (^{14}C) DCCD - Radioaktivität (o--o).

2.3. Isolierung und Charakterisierung des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen

2.3.1. Rohextrakt

Zur Extraktion des DCCD-bindenden Proteins aus Mitochondrien des Rinderherzens wurde zuerst ein Verfahren angewandt, mit dessen Hilfe man die homologen Proteine aus Neurospora crassa und Hefe rein und in guter Ausbeute darstellen konnte (55). Dieses Verfahren, in dem die mitochondrialen Membranen vor der Extraktion gründlich mit organischen Lösungsmitteln gewaschen wurden, erwies sich für die Gewinnung des Rinderherzproteolipids als ungeeignet, da nur 6% der gebundenen Radioaktivität extrahiert werden konnte und das extrahierte Protein stark verunreinigt war.

Daher wurde das Proteolipid ohne Vorbehandlung aus submitochondrialen Partikeln mit neutralem Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Diese Prozedur hat Folch et al. zur Isolierung von Hirnlipiden (65) und Fillingame bei der Extraktion des DCCD-bindenden Proteins aus *E. coli* angewandt (57). Bis zu 40% des (^{14}C) DCCD-markierten Proteins wurde extrahiert (Tabelle 2) mit einer 7,5fachen Anreicherung des spezifischen (^{14}C) DCCD-Gehaltes (nMol/mg Protein). Die Analyse des rohen Proteolipidextraktes durch die Phenol/Ameisensäure-Gelelektrophorese zeigt mindestens acht Polypeptidbanden (Abb. 10B) und einen Gipfel der gebundenen (^{14}C) DCCD-Markierung, der an der gleichen Stelle läuft wie in der Auftrennung der gesamten Membranen.

2.3.2. Reinigung des DCCD-bindenden Proteins durch CM-Cellulose Chromatographie

Ein entscheidender Schritt in der Anreicherung des DCCD-bindenden Proteins aus *E. coli* war die DEAE-Cellulose Chromatographie in Gegenwart von Chloroform/Methanol (57,58). Eine Reinigung des entsprechenden Proteins aus Rinderherzmitochondrien war dagegen nicht möglich, da sowohl das DCCD-bindende Protein als auch die meisten anderen Proteolipide des Rohextraktes nicht an das Austauschergel gebunden wurden.

Die gesamte Rohextraktfraktion wurde aber an CM-Cellulose, die mit Chloroform/Methanol äquibriert wurde, gebunden. Das DCCD-bindende Protein wurde in reiner Form über einen Ammoniumacetat-Gradienten (Abb. 8) bei niedriger Ionenstärke (12-14 mM Ammoniumacetat) eluiert. Die freie und DCCD-modifizierte Form des Proteins wurden an der gleichen Stelle eluiert. Die restlichen Proteine -bei höherer Ionenstärke eluiert (bis 500 mM)- enthielten keine (^{14}C) DCCD-Radioaktivität. 40-50% des aufgetragenen radioaktiven Proteins blieben an der Cellulosesäule gebunden (Tabelle 2). Der spezifische DCCD-Gehalt des Proteins (39 nMol/mg) wurde 35fach angereichert im Vergleich zum Gesamtprotein der Membranen (Tabelle 2). DCCD-bindende Proteine aus Spinat-chloroplasten, Mitochondrien von Neurospora crassa und *E. coli* konnten ebenfalls über CM-Cellulose gereinigt werden (Sebald, unveröffentlichte Experimente).

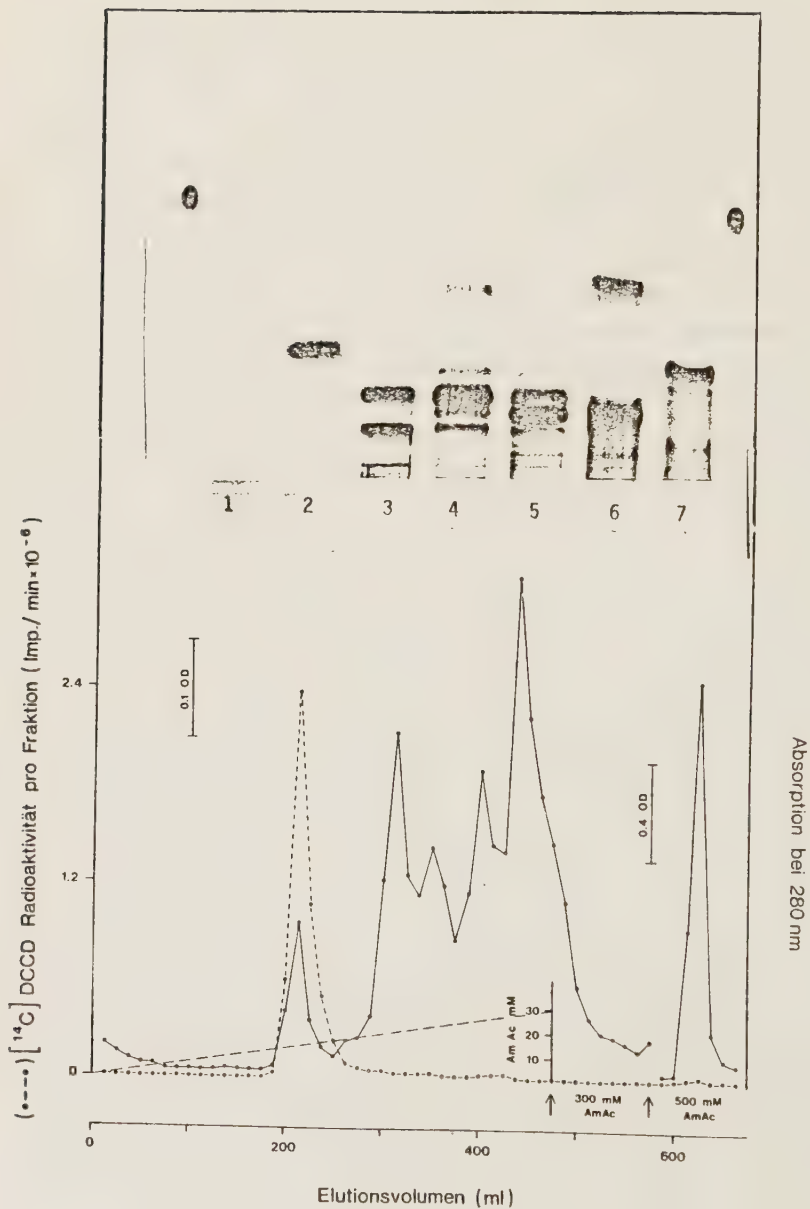


Abb. 8

Abb. 8 CM-Cellulose Chromatographie des Proteolipid-Rohextraktes aus (^{14}C) DCCD-markierten submitochondrialen Partikeln aus dem Rinderherzen

46 mg des Rohextraktes (1 mg/ml), gelöst in Chloroform/Methanol (2:1), wurden auf eine CM-Cellulose Säule von 40 ml Säulenvolumen aufgetragen. Die Säule wurde dann nacheinander mit 50 ml Chloroform/Methanol (2:1), 100 ml Chloroform/Methanol (1:1) und 100 ml Chloroform/Methanol/Wasser (5:5:1) gewaschen. Die Proteine wurden zuerst in einem linearen Ammoniumacetat Gradienten (500 ml, 0-30 mM) bei einer Flußrate von 50 ml/h, dann mit 100 ml 300 mM Ammoniumacetat und zuletzt mit 100 ml 500 mM Ammoniumacetat eluiert, alles in Gegenwart von Chloroform/Methanol/Wasser (5:5:1). Absorption bei 280 nm ($\bullet\text{---}\bullet$) und (^{14}C) DCCD Radioaktivität ($\circ\text{---}\circ$) wurden in 12,5 ml - Fraktionen bestimmt.

Von den vereinigten Gipfelfraktionen der Chromatographie wurde ein Aliquot (je $\bar{0},1$ mg) in der Polyacrylamid Gelelektrophorese in Gegenwart von Phenol/Ameisensäure analysiert.

- | | |
|----|--|
| 1: | sämtliche Fraktionen vor Beginn des Gradienten |
| 2: | Fraktionen im Elutionsbereich 200 - 240 ml |
| 3: | 275 - 350 ml |
| 4: | 363 - 388 ml |
| 5: | 400 - 475 ml |
| 6: | 488 - 525 ml |
| 7: | 600 - 663 ml |

Zur Markierung der Laufstrecke wurde Cytochrom c verwendet.

Reinigung des DCCD-bindenden Proteins aus Rinderherzmitochondrien

Proteinfraktion	Gesamt Protein	Gesamte ¹⁴ C Radioaktivität	Spezifischer (¹⁴ C) DCCD Gehalt
	mg	Impulse x 10 ⁶ x min ⁻¹	nMol DCCD/mg Protein
Submitochondriale Partikel	880 (100)	19,8 (100)	1,12 (1)
Rohextrakt	46 (5)	7,6 (39)	8,3 (7,5)
DCCD-bindendes Protein	5 (0,6)	3,9 (20)	39 (35)

2.3.3. Reinheitskriterien

Das gereinigte DCCD-bindende Protein wandert im Gegensatz zu der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 9) während der Gelelektrophorese in Gegenwart von Phenol/Ameisensäure (Abb. 10C) als einzelne Bande.

Als einzige N-terminale Aminosäure wurde nach Dansylierung Asparaginsäure gefunden. Auch nachdem das Protein mit methanolischer HCl vorbehandelt worden war, wurde keine weitere Aminosäure gefunden. Bekanntlich spaltet diese Behandlung die Formylgruppe von formylierten Aminosäuren ab (75). Eine solche Vorbehandlung war z.B. bei der Bestimmung des N-Terminus des DCCD-bindenden Proteins aus der Hefe notwendig. Die N-terminale Aminosäure dieses Proteins ist Formylmethionin (55).



Abb. 9 SDS-Gelelektrophorese des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen

0,1 mg ätherpräzipitiertes Protein wurde in 0,02 ml SDS-Lösung (2% SDS, 0,1 M Trisbase, 5% Mercaptoäthanol) gelöst und in der Gelelektrophorese analysiert. Danach wurde das Gel gefärbt und entfärbt, wie im experimentellen Teil beschrieben (3.11.4.).

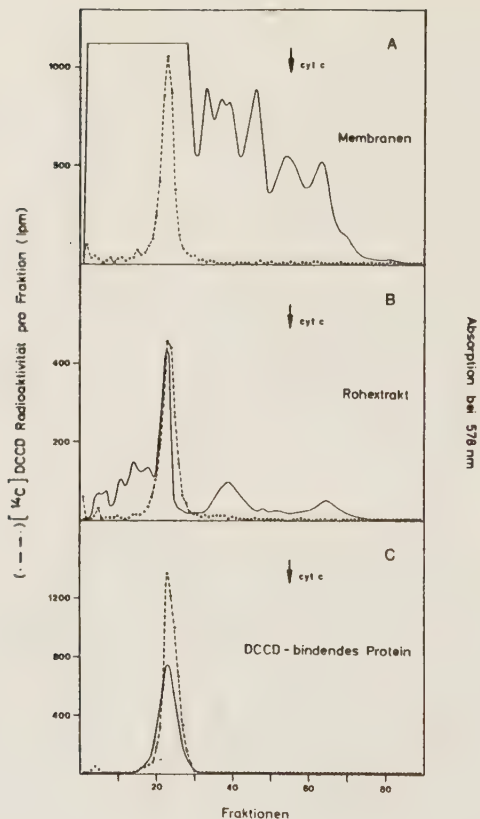


Abb. 10 Phenol/Ameisensäure - Gelelektrophorese von (^{14}C) DCCD-markierten submitochondrialen Partikeln (A), Rohextrakt (B) und gereinigtem DCCD-bindendem Protein (C)

Zwei Proben jeder Proteinfraction wurden in parallelen Bahnen auf der selben Gelplatte aufgetrennt. Das Densitogramm (—) wurde von einem angefärbten Gel eines Aliquots erhalten. Die Verteilung der (^{14}C) DCCD - Radioaktivität (•---•) wurde von dem zweiten, nicht angefärbten Gel bestimmt. Die Position des Markerproteins (Cytochrom c) ist durch Pfeile angezeigt.

2.3.4. Molekulargewicht

Ein minimales Molekulargewicht des Proteolipids von ca. 8 000 Dalton konnte nach Chromatographie über eine Biogel P-30 Säule in Gegenwart von 80% Ameisensäure durch Vergleiche mit Chromatographien der Proteine aus Neurospora crassa und Hefe kalkuliert werden. Wie Abb. 11 zeigt, wurden in der P-30 Chromatographie zwei Proteinfaktionen, eine hochmolekulare und eine mit 8 000 Dalton, eluiert. Daß sich in beiden Fraktionen das DCCD-bindende Protein befindet, konnte durch identische Aminosäureanalysen beider Fraktionen nachgewiesen werden. Durch Perameisensäureoxidation wurde gezeigt, daß sich in der hochmolekularen Proteinfraktion aggregierte Proteolipidformen befanden. Nach dieser Behandlung, in der Disulfidbrücken durch Oxidation getrennt werden, wird das Protein in der Biogel P-30 Chromatographie nur noch an einer Stelle eluiert, die man auf Grund des errechneten Molekulargewichts erwarten konnte (Abb. 12). Es hat den Anschein, daß das nicht-modifizierte Protein eher zur Aggregation neigt als das modifizierte. Denn das Verhältnis von (^{14}C) DCCD-Radioaktivität zu Protein ist in der Fraktion, die das Monomere enthält, wesentlich größer als in der des Aggregates. Außerdem kann unter Umständen durch Perameisensäureoxidation die (^{14}C) DCCD-Markierung vom Polypeptid abgespalten werden. (Abb. 12).

2.3.5. Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse (Tabelle 3) zeigt, daß das Proteolipid aus 78 Resten zusammengesetzt ist. Im gleichen Molekulargewichtsbereich liegen auch die DCCD-bindenden Proteine aus Neurospora crassa, Hefe (55) und *E. coli* (57,58). Wie in diesen Proteinen ist auch im DCCD-bindenden Protein aus dem Rinderherzen der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren ungewöhnlich hoch. Allein Alanin, Glycin, Leucin und Phenylalanin machen über 50% des gesamten Polypeptids aus. Kein Histidin und Tryptophan und nur zwei Lysine, ein Arginin und ein Cystein sind am Aufbau der Polypeptidkette beteiligt.

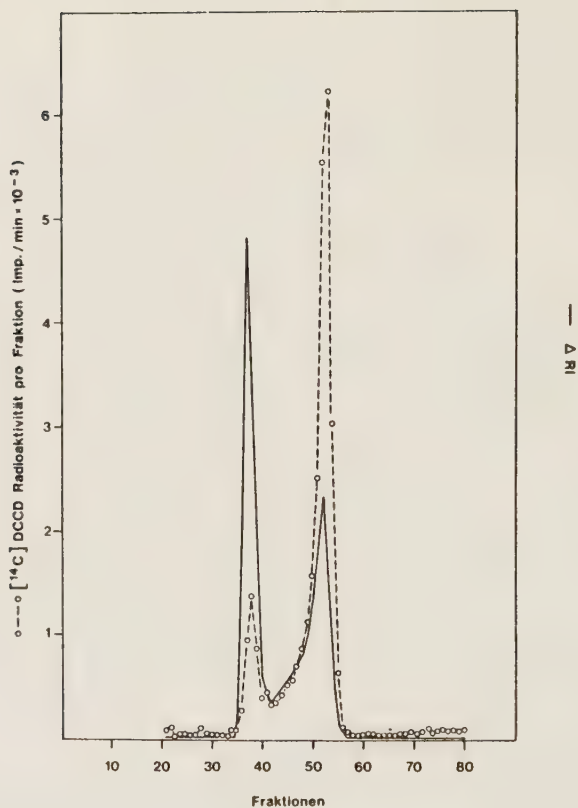


Abb. 11 Biogel P-30 Gelchromatographie des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen

2,2 mg ätherpräzipitiertes Protein (42×10^3 cpm (^{14}C) DCCD Radioaktivität) wurden in 0,3 ml 80% Ameisensäure gelöst und über einer Biogel P-30 Säule (Durchmesser: 0,8 cm, Höhe: 150 cm) bei einer Flußrate von 1,2 ml/h chromatographiert. Das Eluat wurde im Refraktometer (—) registriert, von den einzelnen Fraktionen (0,6 ml) wurde die (^{14}C) DCCD-Radioaktivität bestimmt.

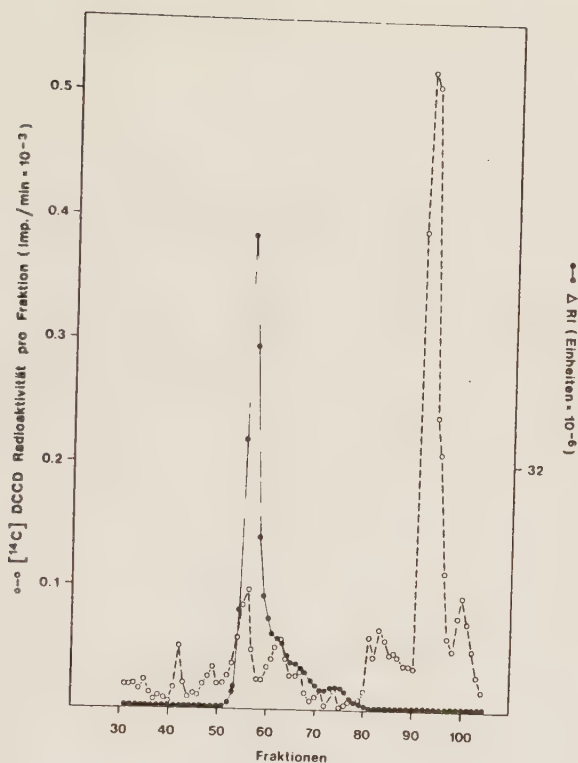


Abb. 12 Biogel P-30 Gelchromatographie des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen nach Perameisensäurebehandlung

3,8 mg (7 500 cpm(^{14}C) DCCD-Radioaktivität) wurden 2 h bei 0°C mit Perameisensäure inkubiert, danach die Persäure abgedampft und die Probe in 0,25 ml 80% Ameisensäure gelöst. Durchführung der Chromatographie und Aufarbeitung der Fraktionen sind identisch mit dem in Abb. 11 beschriebenen Säulenlauf.

(—•—) rel. Refraktometerindex (o--o) (^{14}C) DCCD Radioakt.

T a b e l l e 3

Aminosäurezusammensetzung der DCCD-bindenden Proteine aus
Rinderherz und Rinderleber

Aminosäure	Rinderherz	Rinderleber
Anzahl der Aminosäuren pro Peptid		
Asparaginsäure	3 (3,18)	3 (3,1)
Threonin	3 (3,05)	3 (2,9)
Serin	5 (5,01)	5 (5,4)
Glutaminsäure	3 (3,08)	3 (3,3)
Prolin	1 (0,89)	1 (1,6)
Glycin	12 (11,6)	11 (10,5)
Alanin	14 (13,7)	12 (11,8)
Cystein	1 (1,13)	1 (0,9)
Valin	4 (4,13)	4 (3,6)
Methionin	3 (2,87)	2 (1,9)
Isoleucin	7 (7,02)	6 (5,6)
Leucin	9 (9,38)	9 (8,7)
Tyrosin	2 (2,06)	1 (1,1)
Phenylalanin	8 (8,11)	6 (6,2)
Histidin	-	-
Tryptophan	-	-
Lysin	2 (2,01)	2 (2,4)
Arginin	1 (0,97)	1 (1,0)
Gesamtzahl der der Aminosäurenreste	78	70

2.4. Isolierung und Charakterisierung des DCCD-bindenden Proteins aus der Rinderleber

In der gleichen Weise, mit der das DCCD-bindende Protein aus dem Rinderherzen isoliert wurde, konnte das homologe Protein aus submitochondrialen Partikeln der Rinderleber rein dargestellt werden. Die Ausbeuten des Rohextraktes, bezogen auf mitochondriales Protein, waren durchweg niedriger als im Falle des Rinderherzens (3-4 mg Protein/g SMP). Das DCCD-bindende Protein wurde in der CM-Cellulose Chromatographie bei der gleichen Ammoniumsulfatkonzentration (12-14 mM) eluiert, wie schon unter 2.3.2. beschrieben wurde.

In der Phenol/Ameisensäure-Gelelektrophorese wandert das gereinigte Leberprotein als einzelne Bande mit der gleichen Laufgeschwindigkeit wie das Protein aus dem Rinderherzen.



Abb. 13 Phenol/Ameisensäure - Gelelektrophorese des DCCD-bindenden Proteins aus Rinderlebermitochondrien

0,02 mg ätherpräzipitiertes Protein wurde in 0,03 ml Phenol-Medium gelöst und in der Gelelektrophorese (10% Acrylamid) analysiert. Methodische Einzelheiten sind unter 3.11.4. beschrieben.

Parallel wurde das Proteolipid aus Rinderherz (0,02 mg) aufgetragen.

Während der Biogel P-30 Chromatographie (Abb. 14) wird es mit dem gleichen Elutionsvolumen eluiert wie das Rinderherzproteolipid (Abb. 11). Die Proteinmengen, die nahe dem vorderen Ausschlußvolumen (ca. Fr. 35) eluiert werden, sind viel geringer. Daß es sich in diesem Fall auch um Aggregate des Proteolipids handelt, wurde durch gleiche N-Termini und identische Aminosäureanalysen belegt.

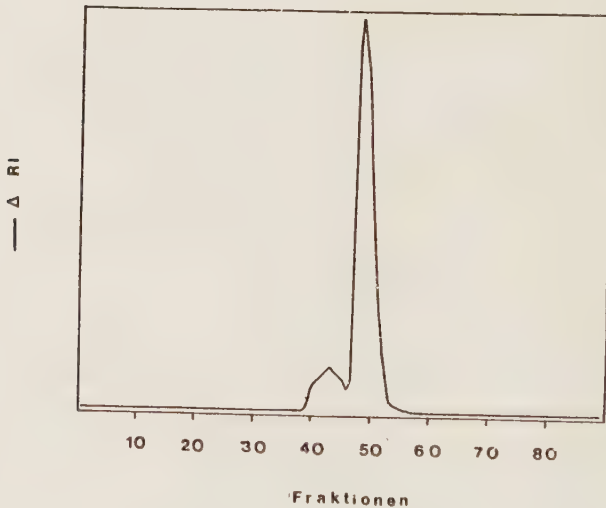


Abb. 14 Biogel P-30 Gelchromatographie des DCCD-bindenden Proteins aus Rinderlebermitochondrien

2 mg des Rinderleberproteolipids wurden nach Präzipitation mit Diäthyläther in 0,3 ml 80% Ameisensäure gelöst und über Biogel P-30, -400 mesh, chromatographiert. Die Säulenmaße waren 0,8 cm x 150 cm, die Flußrate betrug 1,2 ml/h. Das Diagramm zeigt das Elutionsprofil des Säulenlaufes nach Durchlauf des Eluats durch einen Refraktometer.

Das in diesem Abschnitt charakterisierte Proteolipid wurde nicht direkt als DCCD-bindendes Protein identifiziert. Doch sprechen alle angeführten Eigenschaften des Leberproteins dafür, daß es sich um ein dem Rinderherzen homologes, wenn nicht gar identisches Protein handelt:

1. Löslichkeit in Chloroform/Methanol
2. Verhalten während der CM-Cellulose Chromatographie
3. P-30 Gelchromatographie
4. Identische N-Termini

Die Aminosäureanalysen weisen zwar große Ähnlichkeit auf, sind aber nicht identisch. Dies muß nicht bedeuten, daß die beiden Peptide unterschiedliche Primärstrukturen besitzen. Neben methodischen Gründen, die vor allem in der unvollständigen Hydrolyse der Peptidbindungen apolarer Aminosäuren liegen können, kommen proteolytische Prozesse während der Mitochondrienpräparation in Frage. In analytischen Hemm- und Bindungsexperimenten hat sich gezeigt, daß nur äußerst sorgfältige Präparationen der Lebermitochondrien verwertbare Ergebnisse brachten. Die Aminosäureanalyse wurde von Proteinen angefertigt, die aus Mitochondrien angereichert wurden, die im großen Maßstab präpariert wurden. Erst die Bestimmung der Primärstruktur kann eindeutig die Frage nach der Identität klären.

2.5. Die Primärstruktur des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen

2.5.1. Strategie zur Sequenzierung der Polypeptidkette

Zur Aufklärung der Primärstruktur des DCCD-bindenden Proteins wurde der sequentielle Abbau an einem festen Träger (Festphasensequenzierung) gewählt (76). In diesem Verfahren, das erfolgreich zur Sequenzierung der homologen Proteine aus Neurospora crassa und Hefe angewandt wurde (77), wird das Peptid über eine seiner funktionellen Gruppen kovalent an einen festen Träger gebunden und kann dann im Edman-Abbau schrittweise abgebaut werden. Aus methodischen Gründen ist die Länge der bestimmbarer Sequenz begrenzt (78), so daß zur vollständigen Aufklärung der Sequenz die Peptidkette in kleinere Teilstücke gespalten werden muß.

Diese Tatsachen bestimmten die Strategie zur Aufklärung der Primärstruktur:

1. Sequenzierung des ungespaltenen Proteins
2. Sequenzanalyse ausgewählter Spaltprodukte
3. Bestimmung der Reihenfolge der Bruchstücke durch Überlappungspeptide.

Von einer enzymatischen Spaltung des Proteolipids wurde abgesehen, da solche Spaltungen in wässrigem Milieu durchgeführt werden und das Proteolipid in Wasser praktisch unlöslich ist. Chemisch spaltende Reagenzien wie Bromcyan und N-Bromsuccinimid schienen aus zwei Gründen erfolgversprechender. Zum einen läßt sich die Reaktion in einem Lösungsmittel durchführen, in dem beide Partner gut löslich sind (80% Ameisensäure), zum anderen ließ der Gehalt an Methionin und Tyrosin des gesamten Peptids, der aus der Aminosäurenanalyse bekannt war, günstige Spaltprodukte erwarten. In der Isolierung und proteinchemischen Charakterisierung der Spaltprodukte hat man auf eine saubere Trennung der Peptide dann verzichtet, wenn eine selektive Kopplung des Proteins von Interesse möglich schien. Somit hat man einen weiteren Verlust an Material, der eine genaue Sequenzanalyse erschwert hätte, vermieden.

2.5.2. Die Aminosäuresequenz des Proteolipids

Zum besseren Verständnis der folgenden Kapitel wird in einem Überblick die Sequenz des DCCD-bindenden Proteins beschrieben, d.h. von welchen Fragmenten die Teilsequenzen aufgeklärt werden konnten und wie sich aus den Teilsequenzen das Bild der vollständigen Sequenz ergab.

In Abb. 15 ist die Aminosäuresequenz des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen wiedergegeben. Die ersten 43 Positionen wurden durch Sequenzanalyse des ungespaltenen Proteins, das über die Aminogruppe seiner Lysinseitenkette an DITC-Glas als Träger gekoppelt wurde (79), mit 1 μ Mol Protein bestimmt. Der große Ansatz sollte die Identifikation von Aminosäuren bis zum Lysin (in Position 43) gewährleisten. In der Sequenz 1-43 findet sich ein Tyrosin in Position 35. Das zweite Tyrosin sowie alle Methionine liegen in dem nicht erfaßten Teil der Peptidkette.

Nach Spaltung an den Methioninresten mit BrCN wurden drei Fragmente sequenzanalytisch näher untersucht. Die Aminosäurefolge von zwei Spaltprodukten ergab die Sequenzen 61-66 und 67-75. Das dritte Fragment (1-60) wurde mit NBS gespalten, von den vier isolierten Bruchstücken wurde die Sequenz der Fragmente 50-60 (Spaltung am Tyr⁴⁹) und 37-60 (Spaltung am Tyr³⁶, nicht aber am Tyr⁴⁹) aufgeklärt. Durch Überlappung der N-terminalen Sequenz dieses Peptids mit der C-terminalen Sequenz des Teilstückes, das aus der Sequenzanalyse des ungespaltenen Peptids bekannt war (Ala-Arg-Asn-Pro-Ser-Leu-Lys), war die Reihenfolge von 60 Aminosäuren festgelegt.

Die Reihenfolge der beiden kleinen BrCN-Peptide (61-66 und 67-75) war geklärt, nachdem ein Fragment isoliert und sequenziert werden konnte, das durch eine NBS-Spaltung des ganzen DCCD-bindenden Proteins erhalten wurde und das die Sequenz von Alanin in Position 50 bis Methionin Position 75 umfaßt.

Abbildung 15 demonstriert schematisch, von welchen Bruchstücken die Sequenz aufgeklärt wurde und wie durch Überlappungspeptide auf die Reihenfolge der Teilsequenzen und damit auf die vollständige Sequenz rückgeschlossen werden kann.

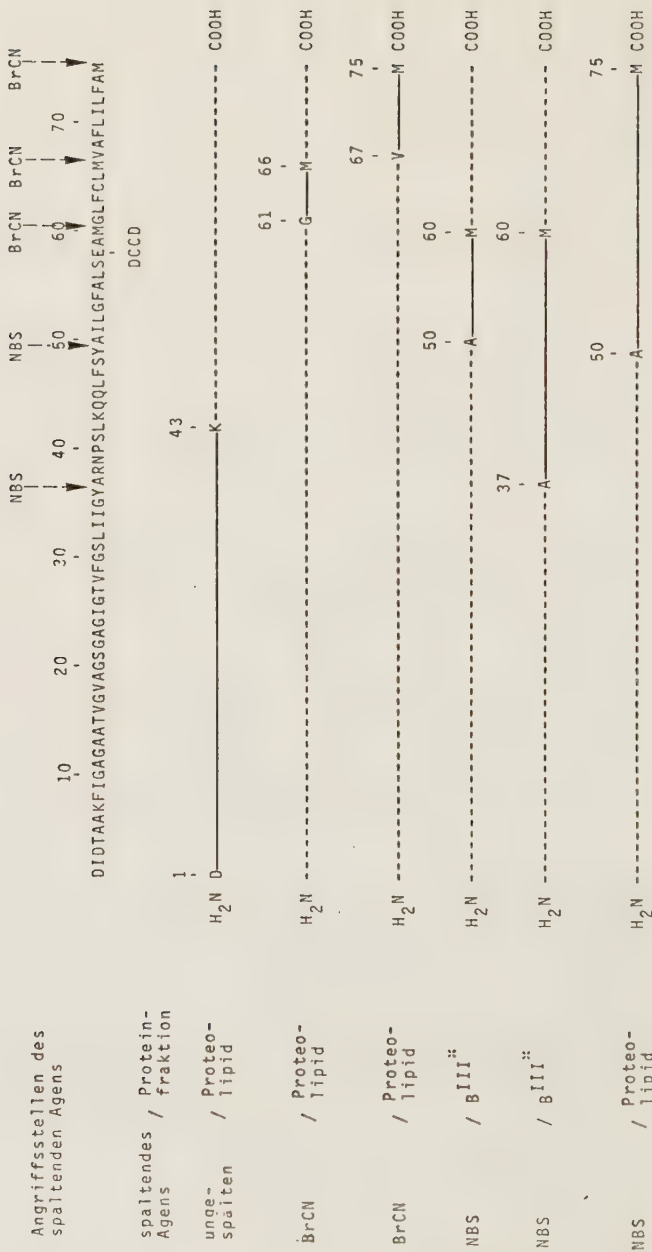


Abb. 15

Abb. 15 Primärstruktur des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen

Die oberste Zeile gibt die Aminosäuresequenz des Proteins im Einbuchstabencode wieder. Die Übersetzung des Codes ist im Abschnitt 6 zu finden. Die Zeilen darunter symbolisieren die Peptidkette des Proteolipids. Durchgezogene Linien bedeuten aufgeklärte Sequenzen in einem bestimmten Experiment. Am Anfang und Ende jeder aufgeklärten Teilsequenz stehen die N-, bzw. C-terminalen Aminosäuren mit ihren Positionen in der gesamten Kette. Die restlichen Positionen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Auf der linken Seite der Abbildung ist angegeben, aus welchem Fragment die Teilsequenz aufgeklärt werden konnte, d.h. welche Proteinfraction mit welchem Agens gespalten wurde, um die rechts dargestellte, aufgeklärte Sequenz zu erhalten. Die Reihenfolge der Teilsequenzen bezieht sich auf die Beschreibung im Text.

← --- mögliche Angriffsstellen von NBS, bzw. BrCN
 :: Gipfel III, siehe Abb. 16 und Text 2.5.3.1.

Refraktometerkurve sieben Abschnitte (I-VII). Das Refraktometer registriert Unterschiede in den Brechungsindices des zulaufenden Mediums zur Elutionsflüssigkeit, d.h. alles Material, das den Brechungsindex verändert, wird registriert. Bei vollständiger Spaltung des Polypeptids an allen drei Methioninen wären maximal vier Spaltprodukte zu erwarten. Vergleicht man die Profile der Biogel P-30 Chromatographien des ungespaltenen Proteins (Abb. 11) und des BrCN-gespaltenen (Abb. 16) miteinander, so findet man im letzteren neben der Schulter bei Fraktion 50 - an dieser Stelle wird das ungespaltene Protein eluiert- noch vier weitere Gipfel im niedermolekularen Bereich, die auf eine Spaltung der Kette hinweisen. In Gipfel III ist das bei weitem meiste Material vereinigt, die übrigen Gipfel sind bis auf Gipfel IV von der selben Größenordnung.

Neben den Brechungsindices wurde die Absorption bei 280 nm der eluierten Fraktionen registriert. In diesem Spektralbereich absorbieren die aromatischen Seitenketten des Tyrosins und Tryptophans. Das Absorptionsverhalten der Chromatographiefraktionen gibt daher Aufschluß über das Vorhandensein eines Tyrosinrestes in dieser Fraktion. Nur die Peptide der ersten drei Abschnitte (I-III) zeigen Absorptionsgipfel bei 280 nm. Ihre Höhen stehen alle im gleichen Verhältnis zu den Refraktometergipfeln. Alle übrigen Abschnitte zeigen keine Absorption.

Die (^{14}C) DCCD-Radioaktivität zeigt an, wo DCCD kovalent an das Protein gebunden wurde.. Nahezu die gesamte Radioaktivität ist im Abschnitt III zu finden. Nur ein geringer Prozentsatz kann Abschnitt I und II zugeordnet werden.

Aufgrund ihrer Elutionsvolumina lassen sich die Molgewichte der einzelnen Proteinfraktionen abschätzen, da man durch die Chromatographie des ungespaltenen Proteolipids und Spaltansätze anderer Proteine, die unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden, bereits einige Anhaltspunkte hatte:

Gipfel I	(Abb. 16)	ca. 15 000	Dalton
Gipfel II		ca. 8 000	
Gipfel III		5 000 - 5 500	
Gipfel IV		2 300 - 2 600	
Gipfel V		1 500 - 2 000	
Gipfel VI		ca. 1 000	
Gipfel VII		700 - 800	

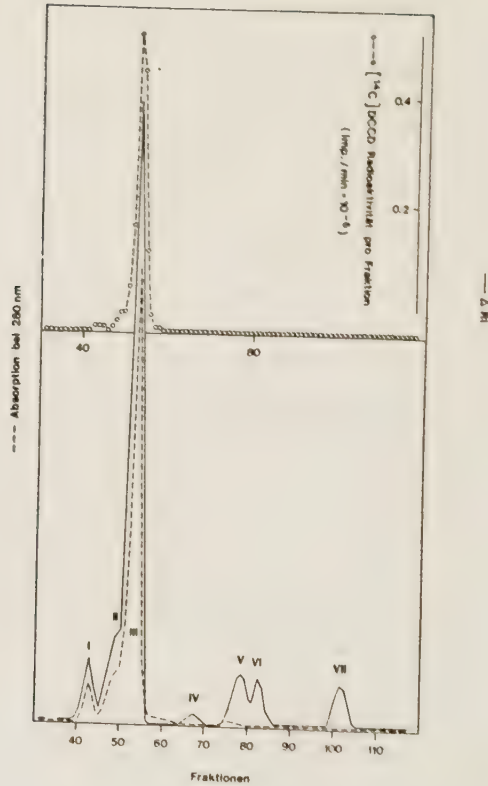


Abb. 16 Trennung der BrCN-Peptide des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen

4 mg Protein ($1,7 \times 10^6$ cpm (^{14}C) DCCD - Radioaktivität) wurden mit BrCN behandelt, wie im experimentellen Teil beschrieben ist. Die BrCN-Fragmente (in 0,5 ml 80% Ameisensäure gelöst) wurden über einer Biogel P-30 Säule chromatographiert. Laufbedingungen und Analytik sind identisch mit der Chromatographie des ungespaltenen Proteins (Abb. 1

— rel. Refraktometerindex
 o--o (^{14}C) DCCD - Radioaktivität
 ---- Absorption bei 280 nm

2.5.3.2. Charakterisierung der BrCN-Peptide

Die eluierten Fraktionen der P-30 Chromatographie wurden proteinchemisch durch weitere Methoden charakterisiert:

1. Die Fraktionen 41-110 wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie untersucht.
2. Die Spitzenfraktionen der sieben Gipfel in Abb. 16 wurden mit Dansylchlorid zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren umgesetzt.
3. Von denselben Fraktionen wurden Aminosäureanalysen angefertigt (Tabelle 4).
4. Von einem ausgewählten Teil der Peptidfraktionen wurde die Aminosäuresequenz bestimmt.

Die Auftrennung der Peptide aus den einzelnen Eluatfraktionen in der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie (Abb. 17) ergibt folgendes Bild:

Zwischen Fraktion 42 und 52 findet man schwache Flecke an der Auftragstelle und starke Flecke bei Fraktion 53-55. Zusätzlich treten in diesen Fraktionen ein Peptid mit einem Maximum bei Fraktion 49-50 auf, mit einem R_f von 0,7 Einheiten, und ein anderes mit einem Maximum bei Fraktion 53-54 und einer etwas geringeren R_f . Eine Kette schwach fluoreszierender Flecken zieht sich im oberen Viertel der Platte zwischen Fraktion 60-70 hin. Die Hauptfraktion in diesem Abschnitt mit Maxima bei 68 und 70 wandert etwas schneller. Parallel dazu findet man einen schwachen Flecken nahe der Laufront. Auf gleicher Höhe befindet sich ein stark fluoreszierender Fleck, der den Fraktionen 76-80 (entspricht Gipfel V) zugeordnet werden kann, und ein weniger intensiv angefärbter Teil über den Auftragstellen der Fraktionen 81-85 (Gipfel VI). Dazwischen wandert mit einem Maximum bei Fraktion 81 ein Peptid mit geringerer Laufgeschwindigkeit, dessen Intensität der Fluoreszenz mit der des Abschnittes 76-80 vergleichbar ist. Im Bereich des Gipfel VII wurden keine flurampositive Flecke gefunden.

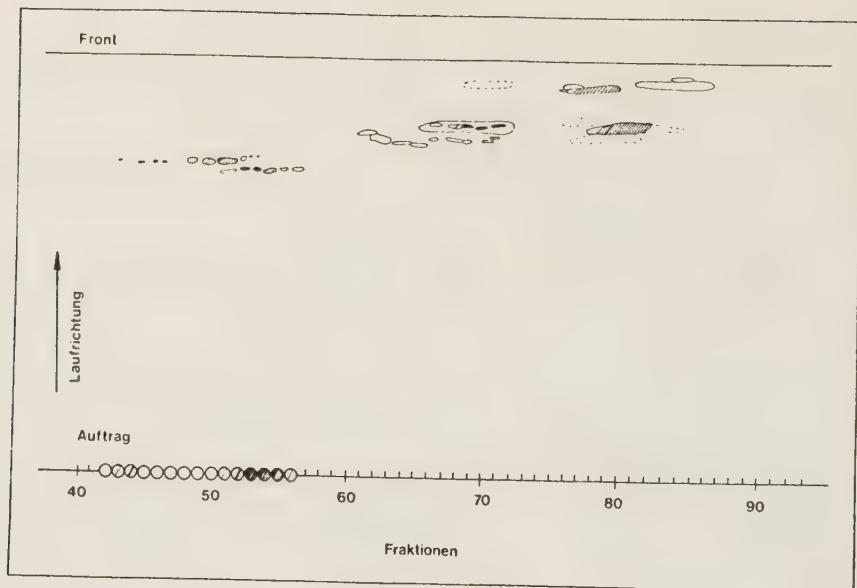


Abb. 17 Dünnschichtchromatographie der BrCN-Fragmente des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen

Die Fraktionen der P-30 Gelchromatographie (Abb. 16) wurden getrocknet, in 0,1 ml 100% Ameisensäure gelöst, und je 2 µl auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte aufgetragen. Nach Chromatographie in Chloroform/Methanol/Ammoniak (2:2:1) wurde die Platte getrocknet und mit Fluram behandelt (6mg/100 ml Aceton). Abb. 17 gibt das Muster der bei 356 nm fluoreszierenden Peptide wieder. Schwarze, stark gestrichelte und schwach gestrichelte Flächen bedeuten Intensitätsgrade der Fluoreszenz (in abnehmender Folge). Gestrichelt umrandete Flächen geben sehr schwache Flecken wieder.

Daß die einzelnen Gipfel der Gelchromatographie nicht alle homogene Peptidfraktionen, sondern Gemische darstellen, wurde in der Dünnschichtchromatographie bereits angedeutet und durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren bestätigt (Tabelle 4).

Asparaginsäure, der N-Terminus der ungespaltenen Peptidkette, wurde als einzige Aminosäure in den Fraktionen 43 (Gipfel I) und 54 (Gipfel II) identifiziert. Neben dieser Aminosäure wurde in Fraktion 49 (Gipfel III) Glycin als N-terminale Aminosäure bestimmt. Ebenfalls Glycin wurde in den Fraktionen 67 (Gipfel IV) und 78 (Gipfel V) gefunden. In Fraktion 78 wurde zusätzlich mit Valin eine weitere Aminosäure bestimmt, die in Fraktion 83 (Gipfel VI) allein mit Dansylchlorid umgesetzt wurde. So kann gefolgert werden, daß mindestens drei Peptide mit unterschiedlichen N-terminalen Aminosäuren vorliegen. Ein viertes Peptid wäre aufgrund des Methioningehaltes des DCCD-bindenden Proteins möglich.

Die Aminosäurezusammensetzung der Spitzenfraktionen wurde als weiteres Charakteristikum zur Beschreibung der BrCN-Peptide herangezogen (Tabelle 4). In Fraktion 43 entspricht sie mit kleinen Abweichungen (Gehalt an Ala, Gly erhöht, Phe erniedrigt) der des ungespaltenen DCCD-bindenden Proteins. Die Tatsache, daß das Peptid Methioninsulfoxid enthält, weist auf nicht umgesetzte Methioninreste hin.

Da nur die Spitzenfraktion dieses Gipfels analysiert wurde, läßt sich die Ausbeute nur abschätzen. Durch Addition der Refraktometereinheiten ergaben sich ca. 80 nMol (16% der eingesetzten Menge).

Aus der Aminosäurenanalyse der Fraktion 49 läßt sich folgendes schließen: der Molgehalt des Homoserins ist deutlich über 1, bezogen auf ein Mol ungespaltenen Proteolipids. Dies deutet darauf hin, daß zwei Homoserinpeptide vorliegen. Gly (+1,1), Cys (+0,4), Leu (+1,7) und Phe (+0,6) sind im Vergleich zur Analyse des ungespaltenen Proteins erhöht. Der erniedrigte Ile-Gehalt läßt sich mit der kurzen Hydrolysedauer erklären (24h). Bekanntlich werden Peptidbindungen, an denen Isoleucin beteiligt ist, besonders schwer hydrolysiert.

Die nach Analyse der Spitzenfraktion geschätzte Ausbeute in diesem Abschnitt beträgt 84 nMol.

Aminosäurezusammensetzung der BrCN-Fragmente nach Biogel P-30 Gelchromatographie

Proteinfraktion ¹	PL	I(43)	II(49)	III(54)	IV(68)	V(78)	VI(83)	VII(102)
					Mol / Mol Peptid ²			
Asparaginsäure	3	2,9	3,1	3,1	-	-	-	-
Threonin	3	2,8	2,9	3,0	-	-	-	-
Serin	5	4,3	4,6	5,3	-	-	-	-
Glutaminsäure	3	3,0	3,1	3,0	-	-	-	-
Prolin	1	1,0	1,0	1,1	-	-	-	-
Glycin	12	13,2	12,1	9,1	2,2	1,1	-	-
Alanin	14	15,0	12,7	10,6	2,3	2,3	2,0	-
Cystein	1	1,0	1,4	-	1,3	0,5	-	-
Valin	4	3,4	4,1	2,9	1,1	1,0	1,0	-
MSO + MSN ³	3	0,24	0,2	-	0,14	-	0,19	-
Homoserin + H.lacton	-	0,8	1,5	0,4	1,4	1,4	0,4	-
Isoleucin	7	7,0	5,9	4,3	1,3	0,8	0,9	-
Leucin	9	9,7	10,7	4,8	5,5	3,9	1,9	-
Tyrosin	2	1,8	1,9	1,9	-	-	-	-
Phenylalanin	8	5,6	7,6	4,0	3,6	3,2	2,2	-
Histidin ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophan	2	1,8	1,9	1,6	-	-	-	-
Lysin	1	1,0	1,0	1,1	-	-	-	-
Arginin	-	-	-	-	-	-	-	-

N-terminale Aminosäure
(relative Intensität der
Dansylfluoreszenz)

Asp	Asp	Asp (1) Gly(0,5)	Gly	Gly (1) Val (1)	Gly(0,1) Val (1)
-----	-----	---------------------	-----	--------------------	---------------------

Menge der Spitzenfraktion⁵
(nMol)

500 (eingesetzt)	14	15	180	12	32	60
---------------------	----	----	-----	----	----	----

us der Aminosäurenanalyse der Fraktion 54, die Gipfel III repräsentiert, war ersichtlich, daß es sich um ein Homoserinpeptid handelt, das kein Cystein und kein Methionin enthält, jedoch alle polaren, sauren und basischen Aminosäuren des Proteolipids.

Ein stark hydrophobes Fragment wurde in Fraktion 68 (Gipfel IV) eluiert. Es ist gekennzeichnet durch einen Cysteinrest, durch einen relativ hohen Homoserinegehalt und Spuren von MSO, was auf nicht gespaltene Methionin-Peptidbindungen hinweist.

Nur wenig verändert ist die Zusammensetzung des Fragmentes, das bei Fraktion 78 (Gipfel V) eluiert wurde. Im Vergleich zu Fraktion 68 ist der Gehalt an Gly, Cys, Leu, Phe erniedrigt. Außerdem liegt kein Methionin, aber Homoserin vor.

Der Gehalt an fast ausschließlich hydrophoben Aminosäuren kennzeichnet auch die Analyse der Fraktion 83. Wenn man davon ausgeht, daß diese Fraktion nur ein einziges Peptid enthält - Dansylierungsergebnisse sprechen dafür -, dann darf man folgende Zusammensetzung annehmen: Ala (2), Val (1), ^{MSN}MSO (1), Ile (1), Leu (2), Phe (2).

BrCN-Fragmente aus zwei Gipfeln (IV und VI) wurden zur Sequenzanalyse herangezogen. Die vereinigten Fraktionen der Gipfel wurden über das Homoserinlacton an das Trägermaterial gekoppelt (82) und sequenziert:

Gipfel IV Gly-Leu-Phe-Cys-Leu-Hse-X-X-Phe-Leu-X-X

Gipfel VI Val-Ala- Phe-Ile-Leu-Phe-Ala-Hse

Erläuterungen zu Tabelle 4

- 1 I-VII: Kennzeichnung der Gipfel in Abb. 16 und im Text 2.5.3.2. (43)-(102): Spitzenfraktionen der Gipfel
- 2 Hilfsmittel bei der Berechnung der Peptidgrößen waren die theoretisch möglichen BrCN-Peptide
- 3 MSO: Methioninsulfoxid MSN: Methioninsulfonsäure
- 4 bestimmt nach Edelhoch (81) im ungespaltenen Protein
- 5 berechnet mit Hilfe der Aminosäurenanalyse

2.5.3.3. Deutung der proteinchemischen Resultate

Die bekannte Sequenz der beiden kleinen BrCN-Peptide machte es möglich zu klären, welche Fragmente in welchen Abschnitten der P-30 Säulenchromatographie gewonnen wurden.

Gipfel I: Fraktionen 40-45

Dünnschichtchromatographie und eine einzige N-terminale Aminosäure deuten auf eine Peptidkette hin. Asparaginsäure als N-Terminus und die Aminosäurenanalyse entsprechen dem des ungespaltenen Proteins. Die Position des Gipfels läßt auf eine dimere Form schließen.

Gipfel II: Fraktionen 46-50

In diesem Abschnitt der Säulenchromatographie wurden zwei Peptide gefunden (Gly und Asx als N-Termini). Die Auswertung der Aminosäurenanalyse und die bekannte Sequenz des BrCN-Hexapeptides lassen folgenden Schluß zu: Neben der ungespaltenen Peptidkette liegt noch in äquimolaren Mengen das kleinste BrCN-Peptid vor. Möglicherweise ist es über eine Disulfidbrücke der Cysteine mit der langen Kette verbunden.

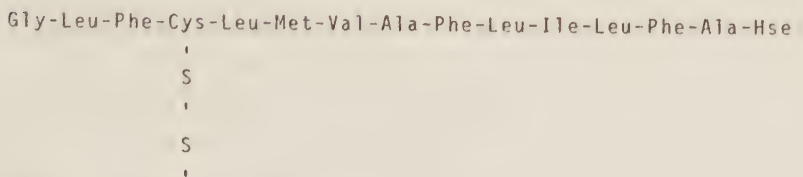
Gipfel III: Fraktionen 52-55

Ein Homoserinpeptid ohne Cystein und Methionin in der Aminosäurenanalyse und nur Asparaginsäure nach der Dansylprobe sprechen, berücksichtigt man noch das Elutionsvolumen, für eine homogene Fraktion, die das größte BrCN-Peptid enthält.

Gipfel IV: Fraktionen 65-70

Sequenzanalysen dieser Fraktion ergaben ein Hexapeptid der bereits beschriebenen Aminosäurefolge. Sorgfältige Prüfung der Aminosäurezusammensetzung ergab, daß außer dem Hexapeptid noch ein weiteres Spaltprodukt vorhanden sein muß. In einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:2 zum Hexapeptid enthielt diese Fraktion ein Homoserinpeptid mit der Zusammensetzung Ala (2), Val (1), Ile (1-2), Leu (2), und Phe (2). Diese Zusammensetzung entspricht dem Peptid des Gipfel VI mit der bekannten Sequenz. Da in der Aminosäurenanalyse nur zwei Homoserine, dagegen Methionin bestimmt wurden, muß

das zweite Peptid direkt als fortlaufende Sequenz an das Hexapeptid gebunden sein. Aus den stöchiometrischen Verhältnissen läßt sich folgende Struktur ableiten:



Gly-Leu-Phe-Cys-Leu-Hse

Gipfel V: Fraktionen 75-80

Nach Dünnschichtchromatographie und Aminosäurenanalyse kann man schließen: die beiden Fraktionen sind Homoserinpeptide, das eine ist mit dem Hexapeptid aus den vorangegangenen Abschnitten identisch, das andere besitzt die gleiche Aminosäurezusammensetzung wie das ebenfalls bekannte Nonapeptid, dessen N-terminale Aminosäure Val ist. Während auf der Dünnschichtplatte sich die beiden Peptide trennen lassen, werden sie in der P-30 Gelchromatographie gemeinsam eluiert. Das Ergebnis der Dansylierung spricht auch für zwei getrennte Peptide. Vermutlich liegt das Hexapeptid auch in dieser Fraktion als Dimer vor (12 Aminosäuren) und läßt sich von dem etwas kleineren Nonapeptid nicht mehr trennen.

Gipfel VI: Fraktionen 82-86

Alle proteinchemischen Untersuchungen charakterisieren die in diesem Abschnitt gewonnene Fraktion als das Nonapeptid der vorangegangenen Abschnitte. Die Sequenzdaten bestätigten diese Annahme.

Gipfel VII: Fraktionen 98-105

Trotz sorgfältiger Analyse mehrerer Säulenläufe des BrCN-gespaltenen Proteins, konnte im Gipfel VII, der regelmäßig registriert wurde, weder eine N-terminale Aminosäure noch ein Gehalt an Aminosäuren in der Analyse, noch flurampositive Flecken festgestellt werden. Offensichtlich handelt es sich hier um nicht-proteinhaltiges Material aus dem Lösungsmittel, Säulenmaterial etc., das nur vom Refraktometer

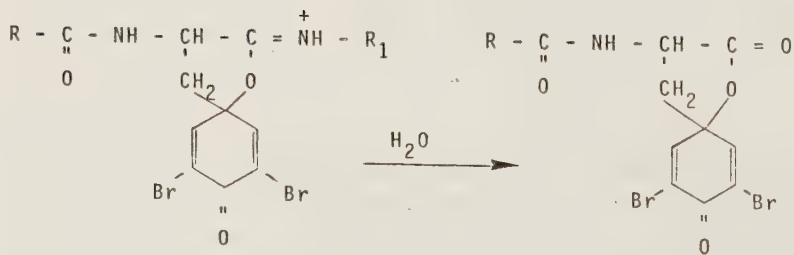
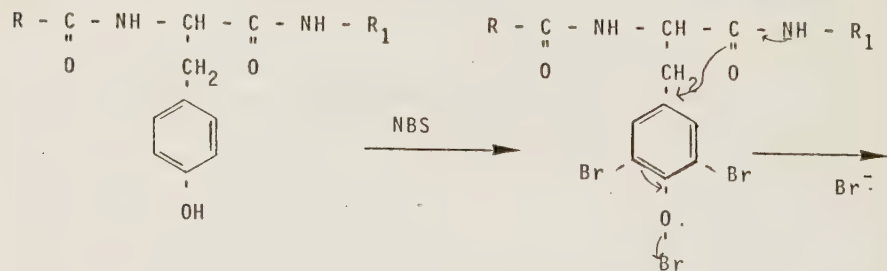
erfaßt wurde.

Zusammenfassend ergab sich aus der BrCN-Spaltung des DCCD-bindenden Proteins, daß dieses Polypeptid durch BrCN mindestens an zwei Stellen gespalten wurde. Es resultierten daraus ein großes BrCN-Fragment, das die DCCD-bindende Gruppe, alle basischen, sauren und polaren Aminosäuren enthält, und zwei kleinere, stark hydrophobe Peptide, deren Sequenz aufgeklärt werden konnte.

2.5.4. NBS-Spaltung des größten BrCN-Peptids

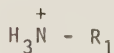
Das größte BrCN-Peptid (Abb.16, Gipfel III) wurde nicht als ganzes sequenziert. Es wurde mit N-Bromsuccinimid (NBS) gespalten, die Spaltprodukte aufgetrennt und deren Sequenz bestimmt.

NBS spaltet die Peptidkette u.a. an der Carboxylseite des Tyrosins (80) Es entsteht dabei ein Spirolacton, das ebenfalls eine starke Absorptionsbande im UV-Bereich besitzt.



Iminolacton

Spirolacton



Aminoacylpeptid

Zur Spaltung wurde die vereinigte Fraktion des Gipfels III der aufgetrennten BrCN-Fragmente in einer Ameisensäuren NBS-Lösung 5 h bei 37 °C inkubiert.

2.5.4.1. Isolierung und Charakterisierung der NBS-Spaltprodukte des größten BrCN-Peptids

Zur Trennung der NBS-Spaltprodukte wurde der gesamte Spaltansatz über eine Biogel P-30 Säule in 80% Ameisensäure gegeben. Vier Maxima (I-IV in Abb. 18) kennzeichnen das Elutionsprofil des Refraktometers. Der Hauptanteil fällt auf die ersten beiden Gipfel, die bei Fraktion 55 bzw. 65 eluiert wurden, der geringste Anteil auf Gipfel III.

Die Absorptionskurve (280 nm) in Abb. 18 zeigt durch die Schulter in Gipfel I, daß dieser Abschnitt keine homogene Fraktion darstellt, während die Gipfel II und III symmetrisch erscheinen. Gipfel III ist durch eine, relativ zum Refraktometergipfel, sehr hohe Absorption bei 280 nm charakterisiert, das Peptid des Gipfel IV dagegen absorbiert in diesem Spektralbereich nicht, d.h. daß es sich um das C-terminale, nicht Tyr-haltige Peptid handelt.

Aus der Verteilung der (^{14}C) DCCD-Radioaktivität ist ersichtlich, daß die Peptide, die mit Gipfel I, II und IV korrelieren, Träger von (^{14}C) DCCD sind.

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren gab den Hinweis, daß die Gipfel II und III mindestens zwei unterschiedliche Peptide enthielten. In beiden Fraktionen wurde Asparaginsäure und Alanin gefunden. Die Dansylierungsreaktion der Fraktion 83 ergab Alanin als N-Terminus.

Von besonderem Interesse war das Peptid in Abschnitt IV, da dieses Peptid die DCCD-bindende Seitenkette enthielt. Die Sequenzanalyse ergab, daß es ein Peptid mit elf Aminosäuren war, die in dieser Reihenfolge vorlagen:

Ala-Ile-Leu-Gly-Phe-Ala-Leu-Ser-Glu-Ala-Hse

|
DCCD

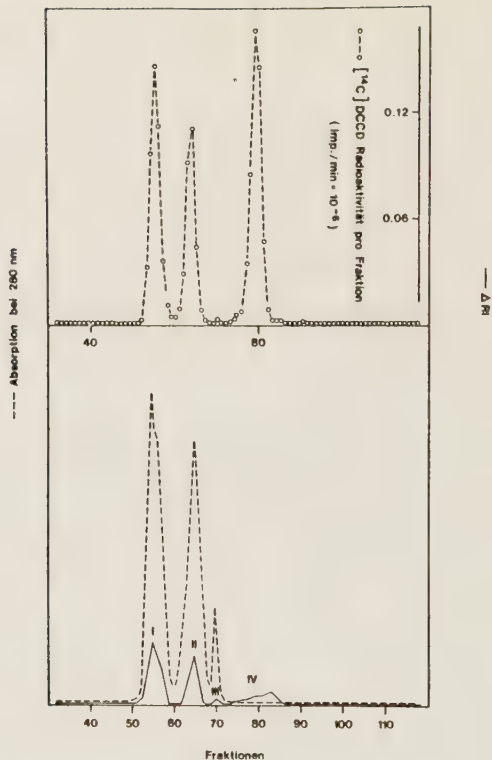


Abb. 18 Biogel P-30 Gelchromatographie der NBS-Fragmente des größten BrCN-Peptides

160 nMol des größten BrCN-Peptides (B III, Abb. 16) ($1,2 \times 10^6$ cpm (^{14}C) DCCD - Radioaktivität) wurden mit NBS gespalten wie unter Methoden beschrieben. Der gesamte Spaltansatz wurde über einer Biogel P-30 Säule chromatographiert. Laufbedingungen und Analytik entsprachen dem Lauf des ungespaltenen Proteins (Abb. 11).

— rel. Refraktometereinheiten
 o---o (^{14}C) DCCD - Radioaktivität
 ---- Absorption bei 280 nm

Als DCCD-bindende Gruppe wurde durch Radioaktivitätsbestimmung der Abbauschritte Glutaminsäure in Position 9 identifiziert (Abb. 19). Da Gipfel II (^{14}C) Radioaktivität enthielt, durfte man in dieser Fraktion ein Homoserinpeptid vermuten, das als Teilsequenz die oben beschriebene Aminosäurenfolge am C-terminalen Ende enthält. Eine selektive Kopplung über das Homoserinlacton ermöglichte die spezifische Bindung dieses Peptids an den Träger, und die Aminosäuresequenz eines Überlappungspeptids wurde festgestellt:

Ala-Arg-Asn-Pro-Ser-Leu-Lys-Gln-Gln-Leu-Phe-Ser-Tyr-Ala-Ile-Leu-Gly-Leu-Phe-Ala-Leu-Ser-Gly-Ala-Hse

Die Aminosäurenanalyse (Tabelle 5) bestätigte, daß neben dem oben angeführten Peptid noch ein zweites Peptid in Gipfel II vorhanden war. Dabei handelt es sich vermutlich um ein Fragment, das vom N-terminalen Ende bis zum Tyrosin³⁶ reicht.

Keine Radioaktivität, Absorption bei 280 nm und die Aminoendgruppe Alanin (neben Asparaginsäure) legte die Vermutung nahe, daß in Gipfel III das Peptid, das zwischen den beiden Tyrosinseitenketten liegt, enthalten war. Aus der Aminosäurenanalyse ging auch deutlich hervor, daß dieses Fragment die Hauptmenge der Fraktion darstellte (20 nMol). Die restliche Komponente ist nicht eindeutig zu identifizieren. Es könnte sich um ein unspezifisches oder acidolytisches Spaltprodukt mit den ersten 15-20 Aminosäuren des Gesamtproteins handeln. Doch kann auch mit dieser Annahme die Analyse nicht befriedigend erklärt werden. Möglicherweise sind mehrere unspezifische Fragmente in dieser Fraktion vereinigt, die eine exakte Analyseninterpretation unmöglich machen.

Die Abschnitte des Gipfel I der Chromatographie wurden nicht näher analysiert, da es wegen seiner Größe für eine Sequenzierung nicht in Frage kam. Sein Elutionsvolumen läßt auf das ungespaltene, große BrCN-Peptid schließen.

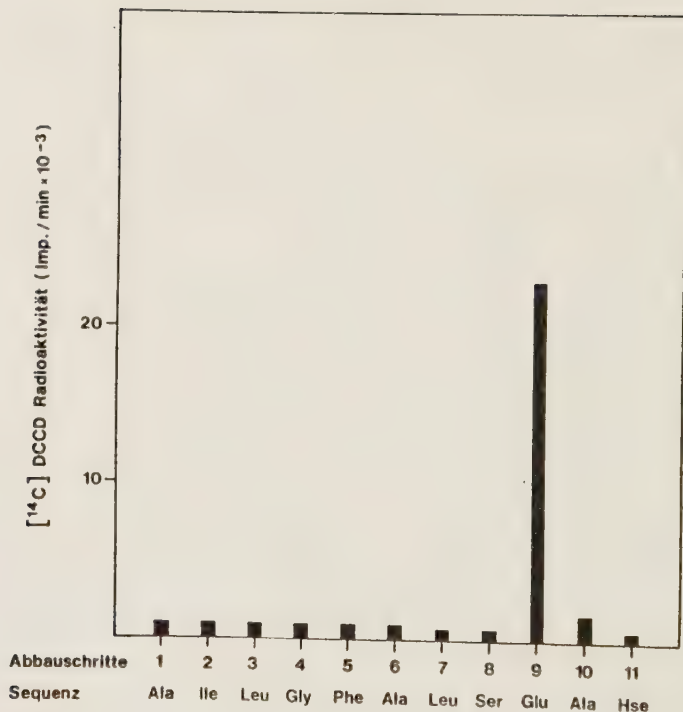


Abb. 19 Identifizierung der Glutaminsäure als DCCD-bindende Gruppe

Die Fraktionen 78-85 der P-30 Gelchromatographie des NBS-gespaltenen BrCN-Peptids (Abb. 18) wurden vereinigt, an einem festen Träger abgebaut und die Aminosäuresequenz bestimmt.

Nach jedem Abbauschritt wurde die (¹⁴C) DCCD - Radioaktivität bestimmt.

T A B E L L E 5

Aminosäurezusammensetzung der NBS-Fragmente des größten BrCN-Peptides
nach Biogel P-30 Gelchromatographie

vereinigte Gipfelfraktionen ¹	B III ²	63-67	68-73
Mol / 100 Mol			
Asparaginsäure	5,0	5,5	7,1
Threonin	5,0	6,0	2,8
Serin	8,3	8,2	12,4
Glutaminsäure	5,0	4,2	11,4
Prolin	1,7	1,4	4,9
Glycin	17,0	20,4	9,6
Alanin	18,7	20,4	15,3
Cystein	-	-	-
Valin	5,0	6,6	2,6
MSO + MSN ³	-	-	-
Homoserin + H.lacton	1,7	0,5	2,8
Isoleucin	10,0	9,0	4,9
Leucin ⁴	8,3	7,7	10,1
Tyrosin	3,3	-	-
Phenylalanin	6,6	5,6	3,5
Histidin	-	-	-
Tryptophan	n.b.	-	-
Lysin	3,3	3,2	6,9
Arginin	1,7	1,3	5,6

N-terminale Aminosäure Asp Asp>Ala Asp<Ala

¹ siehe Abb. 18

² B III siehe Abb. 16; Werte wurden berechnet nach Sequenzdaten

³ MSO: Methioninsulfoxid MSN: Methioninsulfonsäure

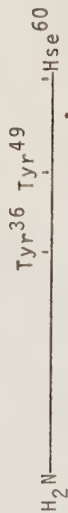
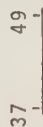
⁴ NBS-Behandlung führt die Tyrosine in Spirolactone über, die in der Analyse nicht erfaßt wurden

2.5.4.2. Ausbeute der NBS-Spaltung

Aus den Radioaktivitätsgehalten der einzelnen Fraktionen und der bekannten spezifischen Radioaktivität des ungespaltenen Proteins, läßt sich zum Teil der Umfang der NBS-Spaltung berechnen. Aus Tabelle 6 geht hervor, daß in Gipfel IV 67 nMol gewonnen wurden, das sind 40% der eingesetzten Menge. Da dieser Abschnitt des Peptids vom zweiten Tyr bis zum C-terminalen Ende reicht, kann ausgesagt werden, daß die Peptidbindung am Tyr⁴⁹ zu 40% gespalten wurde. Das Ausmaß der Spaltung an Tyr³⁶ beträgt auch etwa 40%. Die Ausbeute des Difragmentes des Gipfels II von 24% kann folgendermaßen erklärt werden: Da die Kette am Tyr³⁶ zu 40% gespalten wurde, bleiben noch 60% für die Bruchstücke Ala³⁷-Tyr⁴⁹, Ala³⁷-Hse⁶⁰ und Ala⁵⁰-Hse⁶⁰ übrig. Das Spaltprodukt Ala⁵⁰-Hse⁶⁰ (Gipfel IV) liefert aber nur 40% der Radioaktivität. Die restlichen 20% stammen von dem Peptid Ala³⁷-Hse⁶⁰.

Spaltausbeuten der NBS-Spaltung des größten BrCN-Peptides

Fraktionen der Säulenchromatographie:		¹⁴ C) DCCD Radioaktivität	
Gipfel I (Fr.53-59)		449 x 10 ³ cpm (60 nMol)	36%
Gipfel II (Fr.63-67)		300 x 10 ³ cpm (40 nMol)	24%
Gipfel III (Fr.68-72)		(20 nMol)	12%
Gipfel IV (Fr.77-84)		500 x 10 ³ cpm (67 nMol)	40%
Summe		1 249 x 10 ³ cpm	100%
eingesetzt		1 500 x 10 ³ cpm	



* siehe Abb. 18 und Text 2.5.4.

* symbolisiert die Bindungsstelle für (¹⁴C) DCCD

2.5.5. NBS-Spaltung der vollständigen Peptidkette des DCCD-bindenden Proteins

Nach Behandlung des ungespaltenen Proteins mit NBS in 80% Ameisensäure, wurde die (^{14}C) DCCD-Radioaktivität, obwohl das Protein mit Perameisensäure behandelt worden war, nicht abgespalten, im Gegensatz zu dem Befund, als das ungespaltene Protein in der gleichen Weise oxidiert wurde.

Dieser Befund half bei der Auswahl der geeinten Proteinfractionen zur Sequenzierung des C-terminalen Abschnittes, der die bereits bekannten BrCN-Fragmente enthielt. Von dem gesuchten Peptid konnte man aufgrund der Vorkenntnisse erwarten, daß

1. es Träger der DCCD-bindenden Gruppe ist, d.h., daß es (^{14}C) DCCD-Radioaktivität gebunden hat
2. kein von Tyrosin abgeleitetes Spirolacton besitzt, d.h., daß es bei 280 nm nicht absorbiert
3. als N-terminale Aminosäure Alanin aufweist und
4. es aus ca. 28 Aminosäuren besteht.

Alle diese Eigenschaften trafen auf die Fraktionen, die in den Gipfeln IV und V eluiert wurden, zu. Ihre Aminosäurenanalyse (Tabelle 7) ließ klar den Charakter des C-terminalen Kettenabschnittes erkennen: hoher CysSO_3^- - und MSO -Gehalt, der Anteil des Leucins in der Analyse war deutlich höher als der des Isoleucins, nur Spuren von Threonin, Arginin und Lysin wurden gefunden. Die Analyse machte auch deutlich, daß die Fraktionen unspezifische Fragmente enthielten, die vermutlich durch acidolytische Spaltungen entstanden sind.

Um solche Fragmente dürfte es sich auch bei den Fraktionen handeln, die vom Refraktometer nicht registriert wurden, in der Dünnschichtchromatographie aber deutlich erkannt werden konnten (Abb. 21 Fraktionen 80-90). Die Vielzahl der N-Termini in diesen Fraktionen ebenso wie ihre Aminosäureanalysen charakterisieren die nahezu am hinteren Ausschluß eluierten Proteinfractionen als nicht definierte Spaltprodukte.

Dennoch konnte die Reihenfolge der bisher bekannten Teilsequenzen eindeutig festgelegt werden, nachdem ein Fragment isoliert und se-

quenziert werden konnte, das drei dieser Teilsequenzen enthielt. Dieses Fragment wurde in Gipfel IV (Abb. 20) eluiert. Die Sequenzierung des durch Biogel P-30 Chromatographie isolierten Fragmentes, das C-terminal an die Festphase gekoppelt wurde, ergab folgende Reihen von Aminosäuren:

Ala-Ile-Leu-Gly-Phe-Ala-Leu-Ser-Glu-Ala-MSO₂²-Gly-Leu-X¹-X-Leu-MSO₂-Val-Ala-Phe-Leu-X-Leu-Phe-X-MSO₂

- ¹ die Identität der Aminosäuren an den mit einem "X" bezeichneten Positionen konnte nicht sicher festgestellt werden.
- ² der gesamte NBS-Spaltansatz wurde mit Perameisensäure oxidiert, um das Cystein zur Cysteinsäure zu oxidieren und so eine Dimerisierung von Cys-haltigen Fragmenten zu verhindern. Daher liegen alle Methionin-Reste als Sulfon vor.

2.5.6. Bilanz der Spaltungsergebnisse

Da sowohl die BrCN- wie auch die NBS-Spaltung unvollständig waren, entstand eine Vielzahl von denkbaren Peptidfraktionen in komplexer Zusammensetzung, die zudem durch die Neigung der Cystein-haltigen Fragmente zu Disulfidbrückenbildung kompliziert wurde. Daneben traten noch acidolytische Spaltungen auf. Dies ebenso wie das begrenzte Auflösungsvermögen der Gelchromatographie verhinderten eine vollständige Analyse aller Spaltprodukte.

Dennoch konnte durch gezielte Auswahl bestimmter Fraktionen die Sequenz der gesamten Peptidkette bestimmt werden. Die bestimmten Positionen von Asp¹ bis Met⁷⁵ (Abb.15) ergeben ein widerspruchsfreies Bild, zusammengesetzt aus Sequenzen kleiner Bruchstücke, die als Teilsequenzen auch in größeren Peptiden gefunden werden konnten. Überlappungssequenzen legten die Reihenfolge der Peptide fest. Diese Peptidkette enthält bis auf ein Alanin, ein Glycin und ein Phenylalanin alle aus der Analyse bekannten Aminosäuren. Damit erhebt sich die Frage, ob die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung aus Hydrolyse und Sequenzdaten auf eine Unschärfe in der Bestimmung durch den Analysator zurückzuführen ist oder ob sich an das Met⁷⁵ ein Tripeptid anschließt. Für die erste Möglichkeit spricht:

1. daß bei dem hohen Anteil der fraglichen Aminosäuren eine solche Ungenauigkeit möglich ist,
2. daß bei der Sequenzierung des NBS-Peptids A⁵⁰-Met⁷⁵ keine weiterlaufende Sequenz beobachtet werden konnte,
3. daß nach P-30 Gelchromatographie der BrCN-Peptide kein Peptid gefunden werden konnte, das die erwartete Zusammensetzung gehabt hätte. Allerdings könnte ein solches Peptid wegen seines sehr geringen Molekulargewichts nach dem hinteren Ausfluß eluiert worden sein und so der Analyse entgangen sein.

T A B E L L E 7

Aminosäurezusammensetzung der NBS-Fragmente des DCCD-bindenden Proteins aus Rinderherzmitchondrien nach Biogel P-30 Chromatographie

Gipfel (siehe Abb. 20)	I	II	III	IV	V		
Fraktionen der Gel-	51-60	61-68	69-73	74-75	76-81	82-87	88-101
Chromatographie	Mol / 100 Mol						
Asparaginsäure	6,5	5,6	6,5	3,8	2,0	3,0	8,5
Threonin	4,9	6,4	2,8	1,4	1,5	1,4	2,3
Serin	6,6	5,4	8,4	5,8	5,3	3,9	6,3
Glutaminsäure	5,3	2,2	9,3	7,5	5,8	4,6	3,1
Prolin	2,8	1,2	4,5	2,6	-	0,8	1,3
Glycin	16,6	21,6	10,2	8,5	10,0	6,8	11,0
Alanin	15,4	19,2	14,0	17,1	17,6	16,7	16,8
Cystein	0,6	0,4	0,8	2,9	2,1	9,8	6,6
Valin	8,6	10,7	5,2	6,5	3,8	5,9	5,7
MSO + MSN	0,7	0,5	0,6	4,4	6,1	6,8	4,8
Isoleucin	8,5	11,7	5,3	6,6	7,1	7,4	6,8
Leucin	10,0	6,5	13,7	15,3	22,4	23,6	14,9
Phenylalanin	7,0	6,9	8,7	13,6	14,6	16,0	9,8
Lysin	4,5	3,5	5,0	2,8	1,3	1,2	1,4
Arginin	2,4	0,8	5,3	2,3	-	-	0,5
N-terminale Aminosäuren	Asp	Asp Ile	Asp Ala	Asp Ala	Ala Leu	Ala Gly Phe	Ala Asp Glu Thr Ser und mehr

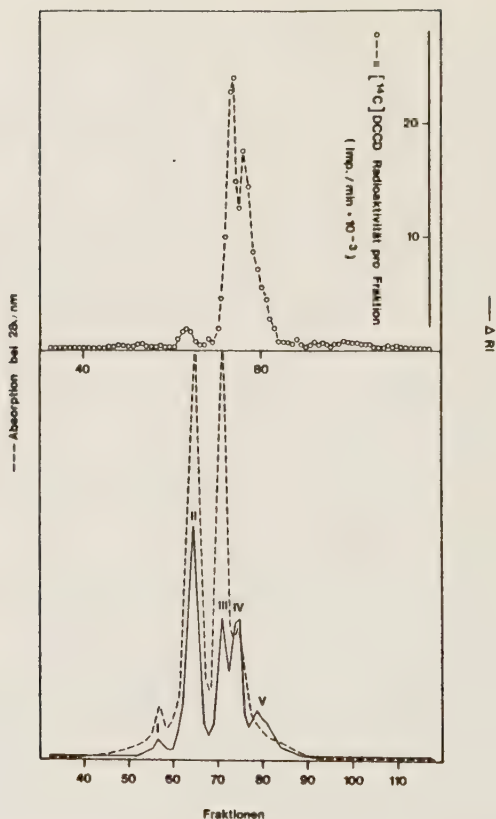


Abb. 20 Auftrennung der NBS-Peptide des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen

4 mg Protein (224×10^3 cpm (^{14}C) DCCD - Radioaktivität) wurden mit NBS gespalten und anschließend mit Perameisensäure oxidiert, wie unter 3.10.4. beschrieben ist. Zur Auftrennung der Peptide wurde der Spaltansatz (0,25 ml) über einer Biogel P-30 Säule chromatographiert.

Laufbedingungen und Analytik entsprachen dem Lauf des ungespaltenen Proteins (Abb. 11).

— rel. Refraktometereinheiten
 o--o (^{14}C) DCCD - Radioaktivität
 ---- Absorption bei 280 nm

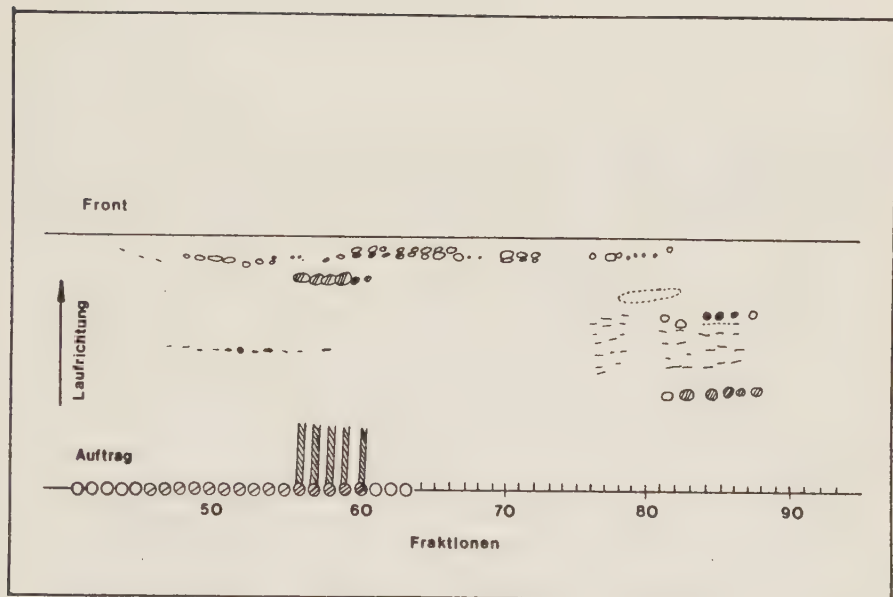


Abb. 21 Dünnschichtchromatographie der NBS-Fragmente des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen

Die Fraktionen der P-30 Gelchromatographie (Abb. 20) wurden behandelt, chromatographiert und detektiert, wie es in der Legende zu Abb. 17 beschrieben ist.

Schwarze, stark gestrichelte Flächen bedeuten Intensitätsgrade der Fluoreszenz, gestrichelt umrandete Flächen geben sehr schwache Flecken wieder.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Präparationen von Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln

3.1.1. Rinderherzmitochondrien

Rinderherzmitochondrien wurden im wesentlichen nach einer Methode von Green et al. (83) isoliert. Die Herzen frisch geschlachteter Tiere wurden von Fett, Gefäßen und Bindegewebe befreit, das Muskelgewebe in Würfel geschnitten und mit eiskaltem Wasser gründlich gewaschen. Nach Passage durch einen Fleischwolf wurde das Fleisch mit 5 Volumen eiskaltem SET-Medium (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-Azetat, pH 7,2) in Gegenwart des Proteaseninhibitors PMSF (0,5 mM) dreimal eine halbe Minute mit einem Braun-Küchenmixer bei maximaler Drehzahl homogenisiert. Das pH wurde mit 10 N KOH auf 7,2 gehalten. Zellkerne, Zelltrümmer und Bindegewebe wurden 10 min bei 1 000xg in einer Stockzentrifuge abzentrifugiert. Die Mitochondrienfraktion wurde durch Zentrifugieren des trüben Oberstandes bei 11 000 x g (60 min) erhalten.

Diente die gewonnene Mitochondrienfraktion Bindungs- bzw. Hemmstudien, wurde das die Mitochondrien enthaltende Pellet zur Nachreinigung in SET-Medium resuspendiert ($p=10$), bei 1 000 x g 60 min zentrifugiert. Die auf eine Proteinkonzentration von 20 mg/ml mit SET-Medium eingestellte Mitochondriensuspension wurde schließlich in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Waren die Mitochondrien Ausgangsmaterial für die Anreicherung des Proteolipids, der F_1 -ATPase oder OS-ATPase, wurden die durch die 11 000 x g Zentrifugation erhaltenen Pellets konzentriert in SET resuspendiert ($p=30$), und bei -20°C gelagert.

3.1.2. Rinderlebermitochondrien

Die Methode zur Isolierung der Rinderlebermitochondrien ist bis auf wenige Abweichungen mit der oben beschriebenen identisch. Das Zerkleinern des Lebergewebes mit dem Fleischwolf wurde weggelassen, die Homogenisierung im Küchenmixer auf 30 sec verkürzt und das pH, wenn

nötig, mit 2 M Trisbase auf 7,2 eingestellt.

3.1.3. Submitochondriale Partikel (83)

Zur Herstellung submitochondrialer Partikel wurde die Mitochondrien-suspension (p=10-15) dreimal 1 min unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier, Modell S-75, Stufe 8). Danach wurde 60 min bei 165 000 x g zentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckman Spin-co L-2, Rotortyp Ti 50). Die Partikel wurden in 10 mM Tris pH 7,5 suspendiert und bei -20°C gelagert.

3.2. Markierung mitochondrialer Membranen mit (^{14}C) DCCD

Submitochondriale Partikel wurden mit einer Proteinkonzentration von 10-15 mg/ml mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein (^{14}C) DCCD (10 mg/ml in absolutem Äthanol) bei 0°C inkubiert. Nach vier Stunden wurden die Membranen im Verhältnis 1:1 mit 10 mM Tris-Azetat, pH 7,5 verdünnt und 1 Stunde bei 165 000 x g zentrifugiert. Aus den präzipitierten Partikeln wurden dann entweder direkt Proteolipide extrahiert oder die Membranen wurden in 10 mM Tris-Azetat, pH 7,5 resuspendiert, wenn aus ihnen die OS-ATPase angereichert werden sollte.

Zur Bestimmung von gebundener (^{14}C) DCCD Markierung wurde das Inkubationsgemisch zehnfach mit 10mM Tris-Azetat, pH 7,5 verdünnt, und die Membranen bei 165 000 x g (30 min) abzentrifugiert. Das Sediment wurde fünfmal mit Chloroform/Methanol/Äther (2:1:12; v/v/v) gewaschen. Die getrockneten Proteine wurden in 2% Dodecylsulfat gelöst, und Aliquots zur Bestimmung von Protein und Radioaktivität verwendet.

3.3. Hemmung der ATPase-Aktivität von Mitochondrien aus dem Rinderherzen durch DCCD

0,2 ml Rinderherzmitochondrien, suspendiert in SET, pH 7,2 (5mg/ml), wurden mit steigenden Konzentrationen (^{14}C) DCCD bei 0°C inkubiert. Dazu wurden 10 μl einer alkoholischen Lösung des Inhibitors (0-0,4 mg/ml Äthanol) den Mitochondrien zugesetzt. Unter diesen Bedingungen blieb die ATPase-Aktivität der Carbodiimidfreien Probe über mehrere Stunden konstant. Nach 4 h wurden jedem Ansatz Aliquots entnommen und die ATPase-Aktivität bestimmt.

3.4. Anreicherung der OS-ATPase aus dem Rinderherzen (33)

Alle Anreicherungsschritte wurden bei 0-4°C durchgeführt.

Schritt 1: Zu einer Suspension von SMP (23 mg/ml) wurde soviel einer 10%igen Lösung (w/v) K-Desoxycholat (pH 8,0) und festes KCl gegeben, daß eine Endkonzentration von 0,3 mg DOC pro mg Protein, bzw. eine 1 M KCl-Lösung erreicht wurde. Das Gemisch wurde einige Minuten gerührt und 20 min bei 78 500 x g zentrifugiert. Dadurch wurde eine grüne, unlösliche Fraktion entfernt. Der klare, rote Überstand wurde gegen 6 l einer 10 mM Tris-Azetat-Lösung, pH 7,5, dialysiert. Nach 2 h wurde die trübe, dialysierte Suspension 15 min bei 78 500 x g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation erhielt man ein schwammiges, rotes Pellet und einen gelben Überstand.

Schritt 2: Der Überstand wurde auf eine mit 10 mM Tris-Azetat, pH 7,5, äquilibrierte Sephadex-Säule (G-25 coarse, 5,5 cm x 18 cm) aufgetragen. Die trüben Eluate wurden vereinigt und 1 h bei 165 000 x g zentrifugiert. Das feste, klare Pellet wurde in ST-Medium, pH 7,2, das 1 mMol/l Dithiothreitol enthielt, resuspendiert und mit einem Potter-Elvehjein-Homogenisator homogenisiert.

Schritt 3 : Zu der Dispersion (p=15) wurde soviel einer 20%igen (w/v) K-Cholat-Lösung (pH 8,0) gegeben, daß eine Endkonzentration von 0,5 mg Cholat pro mg Protein erreicht wurde. Eine gesättigte Ammonsulfat-Lösung (pH 7,5) wurde zugegeben bis eine 25%ige Sättigung erreicht war. Nach Zentrifugation bei 165 000 x g (15 min) wurde der Überstand auf eine 42%ige Sättigung an Ammonsulfat gebracht. Das Präzipitat, erhalten nach 10minütiger Zentrifugation bei 165 000 x g wurde in ST-Medium, pH 7,5, gelöst. Die Proteinkonzentration betrug 20-30 mg/ml.

Schritt 4 : Die konzentrierte Lösung wurde auf eine Sephadex-Säule (G-25 coarse, 1 cm x 7 cm) aufgetragen, die mit 10 mM Tris-Azetat, pH 7,5, äquilibriert war; das Protein wurde mit demselben Puffer eluiert. Das trübe Eluat wurde mit 2 Volumen des Puffers verdünnt und 15 min bei 165 000 x g zentrifugiert. Das Protein-Pellet wurde in ST-Medium, 1 mM Dithiothreitol, resuspendiert.

Nachreinigung: Zu dem in SET aufgenommenen Präzipitat der 25% Ammon-

sulfatfällung, bzw. zu der Proteinsuspension nach Schritt 4, wurden soviel 20% K-Cholat (pH 7,6) und gesättigte Ammonsulfatlösung (pH 7,5) zugegeben, daß die Cholatkonzentration 4,2 mg pro mg Protein betrug und die Ammonsulfatlösung 10% gesättigt war. Das Präzipitat, nach Zentrifugation bei 27 000 x g (15 min), wurde verworfen, der Oberstand auf 38% Ammonsulfatsättigung gebracht. Dieses Präzipitat und das, welches nach einer Fällung mit 42% Ammonsulfat erhalten wurde, stellten Proteinfraktionen dar, die nur noch wenige Verunreinigungen -sichtbar nach SDS-Gelelektrophorese- enthielten (Abb.6).

3.5. Immunpräzipitation des ATPase Komplexes

Die F_1 -ATPase des Komplexes wurde durch Chloroformbehandlung von Mitochondrien in Lösung gebracht (84). Das gereinigte F_1 -Protein wurde dann zur Gewinnung von Antikörpern in Hühnern verwendet. Der gesamte ATPase Komplex wurde mit Hilfe des Antiserums gegen F_1 aus Triton X-100 solubilisierten SMP (oder Mitochondrien) gewonnen (74).

3.5.1. Herstellung des Antigens

Alle Arbeitsvorgänge wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Mitochondrien wurden in TEA (10 mg Protein pro ml) und dem gleichen Volumen Chloroform vorsichtig geschüttelt, bis eine homogene Emulsion entstanden war. Nach Zentrifugation bei 10 000 x g (10 min) wurde die gelblich trübe Wasserphase durch eine weitere Zentrifugation (20 000 x g, 15 min) geklärt. Die Chloroformphase und die unlösliche Zwischenphase wurden verworfen. Der klare Überstand wurde sofort auf eine DEAE-Cellulose Säule (20 g DEAE pro 3 g Mitochondrien), äquilibriert mit TEA, aufgetragen. Die Säule wurde zuerst mit TEA und dann mit TEA, 30 mM KCl gewaschen, bis sämtliches braunes Material entfernt war. Die das F_1 enthaltende Fraktion wurde als gelbe Bande mit TEA, 0,3 M KCl, eluiert.

Das eluierte Protein wurde durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (50 g pro 100 ml) präzipitiert und dann in einem kleinen Volumen TEA (30-40 mg Protein/ml) aufgenommen. Nach Abzentrifugieren der Trübung (20 000 x g, 5 min) wurde die Lösung auf eine Biogel A-0,5 m Säule (5cm x 150cm), äquilibriert mit TEA, aufgetragen. Die Säulenchromatographie wurde bei einer Flußrate von 30-40 ml pro Stunde durchgeführt. Die eluierten Proteinfraktionen wurden bei 280 nm registriert. Das F_1 -Protein wurde in ca. 100 ml kurz nach dem vorderen Ausschlußvolumen eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und die F_1 -ATPase mit festem Ammoniumsulfat (50 g/100 ml) ausgefällt. Die Suspension wurde bei 0°C gelagert.

3.5.2. Gewinnung des Antiserums

Das F_1 -Protein, gelöst in TEA (4-5 mg/ml) wurde mit dem vierfachen

Volumen Freud's Adjuvans (complete) gemischt bis eine homogene Emulsion entstanden war. 1 ml der Emulsion (ca. 1 mg F_1) wurde an 4 bis 5 Stellen in den Brustmuskel von Hühnern injiziert. Die Injektion wurde nach vier Wochen mit 2-3 mg wiederholt. Nach zwei weiteren Wochen wurde das Huhn entblutet. Das Blut (30-40 ml) ließ man 6 h bei Raumtemperatur stehen. Danach wurde der Blutkuchen abzentrifugiert und das Serum bei -20°C gelagert. Der gebildete Antikörper wurde durch die Hemmung der ATPase-Aktivität von F_1 durch das Serum nachgewiesen.

3.5.3. Immunpräzipitation

Mitochondrien (1 mg) wurden in 0,4 ml Phosphatpuffer (0,3 M K_2HPO_4 , 2 mM ATP, 10% Äthylenglykol, 5 mM EDTA und 0,5 mM Dithiothreitol, pH 7,9) suspendiert, 50 μl 3 M KCl und 50 μl 5% Triton X-100 (w/v) wurden zugegeben. Unlösliches Material wurde bei $12\,000 \times g$ (5 min) abzentrifugiert, der Überstand mit 1 ml Antiserum gegen F_1 bei 0°C inkubiert. Die Inkubationszeit schwankte zwischen 10 und 24 h.

Das Präzipitat, erhalten nach Zentrifugation bei $12\,000 \times g$ (5 min), wurde dreimal mit 1 ml 0,3 M KCl, 10 mM Tris-Azetat, pH 7,5, einmal mit 1 ml 0,5% DOC, 0,3 M KCl, 10 mM Tris-Azetat, pH 7,5 und schließlich mit 1 ml 10 mM Tris-Azetat, pH 7,5 gewaschen. Zur Dissoziation wurde der Proteinkomplex mit 2% SDS, 0,1 M Tris-Azetat, pH 8,5, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

3.6. Isolierung des DCCD-bindenden Proteins

Alle Mischungsverhältnisse in diesem Abschnitt sind als Volumenverhältnisse zu verstehen.

3.6.1. Rohextrakt (57)

1-4 g Membranpellet wurde mit dem ca. 20fachen Volumen an Chloroform/Methanol (2:1) in einem Braun Küchenmixer gründlich gemixt (5-10 sec). Die Suspension wurde über Nacht bei 4°C gerührt und 10 min bei 2 200 x g zentrifugiert. Der klare, goldgelbe Überstand wurde in einem Schütteltrichter mit 0,2 Volumen Wasser versetzt und vorsichtig geschüttelt. Danach ließ man das Gemisch zuerst 30 min bei 4°C, dann mehrere Stunden bei Raumtemperatur stehen, bis sich die zwei Phasen vollständig getrennt hatten. Die obere (wässrige) Phase wurde zweimal mit 0,04 Volumen Chloroform/Methanol/Wasser (3:47:48) gewaschen. Die untere, gewaschene Phase wurde dann unter ständigem Rühren mit 1 Volumen Chloroform versetzt, wobei die Lösung durch Zugabe von wenig Methanol klar gehalten wurde. In einem Rotationsverdampfer wurde das Volumen der Lösung bei 35°C bis auf 3-5 ml eingengt. Eine eventuell auftretende Trübung mußte mit wenigen ml Chloroform/Methanol (10:1) beseitigt werden, da sonst die Proteolipide irreversibel aggregieren. Zu der konzentrierten Proteinfraktion wird das 5fache Volumen Äther (auf -20°C herabgekühlt) gegeben und 16-20 h bei -20°C stehen gelassen. Die gefällten Proteolipide wurden in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst.

Dieser Rohextrakt kann bei -20°C über mehrere Monate hinweg, ohne irgendwelche Veränderungen zu zeigen, gelagert werden.

3.6.2. CM-Cellulose Chromatographie (85)

Präparation des Gels: 40 g CM-Cellulose wurden 30 min in 500 ml Eisessig gerührt, die Essigsäure mit 3 l Wasser über eine Nutsche ausgewaschen und das Gel wiederum 30 min in 500 ml 25% Ammoniak gerührt. Danach wurde zuerst mit 2-3 l Wasser, dann mit 500 ml Methanol, 500 ml Chloroform/Methanol (1:1) und schließlich mit 200 ml Chloroform/Methanol (2:1) gewaschen.

Gel-Chromatographie: Die Rohextrakt-Fractionen (40-80 mg) wurden in Chloroform/Methanol (2:1) auf die CM-Cellulose Säule (40 ml, äquiliбриert in Chloroform/Methanol (2:1)) aufgetragen und die Säule mit 100 ml Chloroform/Methanol 2:1, 100 ml Chloroform/Methanol/Wasser (5:5:1) gewaschen. Das DCCD-bindende Protein wurde dann mit einem Ammoniumazetatgradienten von 0 bis 30 mM in Chloroform/Methanol/Wasser (5:5:1) bei einer Flußrate von 50 ml/h eluiert. Die vereinigten Fractionen wurden konzentriert, indem zuerst soviel Chloroform und Wasser dazugegeben wurde, daß ein Verhältnis Chloroform/Methanol/Wasser 8:4:3 erreicht wurde. Nach Mischen der Lösungsmittel und Zentrifugieren entstanden eine wässrige Phase oben, und eine organische Phase unten. Die obere Phase wurde verworfen, die untere gewaschen und konzentriert, wie schon beschrieben. Das konzentrierte Proteolipid wurde mit 4-5 Volumen Diäthyläther (-20°C) ausgefällt (16-20 h, -20°C) und in Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen.

3.7. P-30 Gel-Chromatographie

Das ungespaltene Proteolipid sowie die Spaltansätze der BrCN-, bzw. NBS-Spaltungen wurden unter identischen Bedingungen über Bio-Gel P-30, -400 mesh chromatographiert.

200-500 μl einer Proteinprobe in 80% Ameisensäure (5-10 mg Protein/ml) wurden auf die Säule (0,8 cm x 150 cm), äquiliбриert in 80% Ameisensäure, aufgetragen, die bei einer Flußrate von 1,2 ml pro Stunde betrieben wurde. Das Absorptionsverhalten des Eluates bei 280 nm und sein relativer Brechungsindex, gemessen in einem Refraktometer, wurden registriert.

3.8. Spaltungen des DCCD-bindenden Proteins

3.8.1. BrCN-Spaltung (80)

0,2-0,5 μ Mol ätherpräzipitiertes Protein wurden in 400-800 μ l einer 1 M BrCN-Lösung in 80% Ameisensäure gelöst und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Spaltansatz wurde anschließend bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeeengt, zweimal in 80% Ameisensäure aufgenommen und wieder eingetrocknet. Nach Lösen in 0,2-0,5 ml 80% Ameisensäure wurde die Probe auf der P-30 Säule chromatographiert.

3.8.2. NBS-Spaltung (80)

Ein 100facher Überschuß an NBS, bezogen auf die Tyrosine, wurde in konzentrierter Ameisensäure gelöst und zu dem ätherpräzipitierten oder getrockneten Protein (BrCN-Peptid) gegeben. Hatte sich das Protein vollständig gelöst, wurde die Lösung auf 80% Ameisensäure gebracht.

3.9. Synthese von (^{14}C)DCCD

Ausgangsmaterial für die Synthese des (^{14}C) Carbodiimids war (^{14}C) Harnstoff (47,1 mCi/mMol). (^{14}C) Dicyclohexylharnstoff wurde nach einer Methode von Amiard et al. (86) aus Harnstoff und Cyclohexylamin synthetisiert. Das (^{14}C) Carbodiimid wurde durch Reaktion des Dicyclohexylharnstoffs mit POCl_3 in Pyridin hergestellt (87). Das (^{14}C) DCCD wurde bei -20°C in Petroläther gelagert.

3.10. Proteinchemische Methoden

3.10.1. Dünnschichtchromatographie

0,1-1 nMol Peptid aus den Säulenfraktionen wurden nebeneinander auf Kieselgel-Fertigplatten (Merck, ohne Fluoreszenzindikator, 0,25 mm Schichtdicke, 20 cm x 20 cm) aufgetragen und in Chloroform/Methanol/25%igem Ammoniak 2:2:1 (v:v:v) chromatographiert (88). Nach 1 h Trocknen bei 110°C wurden die Platten mit einer Lösung von Fluorescamin in Aceton (6 mg/100 ml) überstrichen und nach 15 min bei 350 nm betrachtet (89). Zum Anfärben nach der Methode von Hoppe und Reindl (90) wurden die Platten in eine mit KMnO_4 und HCl gefüllte Chlorgaskammer gestellt (15-30 min), und anschließend mit Druckluft abgeblasen. Die Anfärbung erfolgte durch Besprühen der Platten mit folgender Lösung: 1 l 0,05 M wässrige KJ, 3 g Tolidin und 20 ml Eisessig, mit Wasser auf 2 l aufgefüllt.

3.10.2. Bestimmung des N-Terminus mit der Dansyltechnik (91)

0,2-1 nMol Peptid wurden in einseitig zugeschmolzenen Glasröhrchen eingetrocknet. Der Rückstand wurde mit 10 µl 0,2 M CaHCO_3 alkalisch gemacht und wieder eingetrocknet. Anschließend wurde die Probe mit 2 x 10 µl Dansylchloridlösung (2 mg/ml in Aceton:Wasser 1:1) versetzt, 10-20 min bei 37°C gehalten und zur Trockene eingeengt. In 50 µl 5,7 N HCl wurde dann 8-10 h bei 105°C hydrolysiert. Das eingetrocknete Hydrolysat wurde zur Identifizierung in 10 µl 95% Äthanol aufgenommen, und 1-3 µl auf beidseitig beschichteten Polyamidplatten (5 cm x 5 cm) aufgetragen. Die Chromatographie wurde in folgenden Laufmitteln ausgeführt:

Laufmittel I: 1,5%ige HCOOH

dann senkrecht dazu

Laufmittel II: Benzol/Eisessig (10:1; v/v)

in der gleichen Laufrichtung

Laufmittel III: Essigsäureäthylester/Methanol/Eisessig
(20:1:1; v/v/v).

Die Identifizierung erfolgte unter einer UV-Lampe (350 nm) anhand eines auf der Rückseite der Platten chromatographierten Vergleichsstandards aus dansylierten Aminosäuren.

Um eine eventuell vorhandene Formylgruppe eines Formylmethionins abzuspalten, wurde ein Aliquot des Peptids 24 h in methanolischer HCl (1 N) bei Raumtemperatur inkubiert (75).

3.10.3. Aminosäurenanalyse

0,2-1 nMol des Peptids wurden in einem abgeschmolzenen Glasröhrchen eingetrocknet und in 200 μ l 5,7 N HCl bei 105°C 24-120 h hydrolysiert. Das eingetrocknete Hydrolysat wurde in einem Citratpuffer (Na-Citrat pH 2,4) aufgenommen und in einem Durrum-Analysator analysiert.

3.10.4. Perameisensäureoxidation (92)

Das getrocknete Protein wurde in Perameisensäure (2-4 mg Protein/ml) 2 h bei 0°C inkubiert. Die Perameisensäure wurde abgedampft und das Protein in 80% Ameisensäure gelöst.

Zur Herstellung der Perameisensäure wurden 9,5 ml 100% Ameisensäure mit 0,5 ml Perhydrol (30%) gut gemischt und 2 h bei Raumtemperatur belassen.

3.11. Sonstige analytische Methoden

3.11.1. Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die ATPase-Aktivität wurde bei 37°C in 0,5 ml Testlösung (10 mM ATP, 5 mM MgCl, 0,1 M Tris-Azetat, pH 8) gemessen (93). Die Bildung des anorganischen Phosphats war mindestens 10 min lang linear, wenn sich 0,1 oder weniger ATPase Units ($\mu\text{Mol P}_a/\text{min}$) pro ml im Testansatz befanden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml Tri-chloressigsäure (50%) beendet.

Das freigesetzte, anorganische Phosphat wurde nach einer modifizierten Methode von Fiske und Subarow bestimmt: Zu den Proben wurden 50 μl einer Metol-Lösung (15 g Natriumpyrosulfit und 0,2 g Metol in 100 ml Wasser) und 0,1 ml einer Molybdatlösung pipettiert. Nach 10 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 0,5 ml 2 M Trisbase gestoppt und die Extinktion bei 578 nm gemessen.

Zur Bestimmung der Oligomycinhemmbarkeit wurde in den Testansatz 5 μl einer äthanolischen Oligomycin-Lösung (2 mg/ml) pipettiert.

Zur Herstellung der Molybdatlösung wurden 12,5 g Ammoniumheptamolybdat in 100 ml heißem Wasser gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurden 125 ml 10 N Schwefelsäure zugefügt und mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt.

3.11.2. Radioaktivitätsmessungen

Die Proteinproben wurden direkt- oder gelöst in 0,5 ml Dodecylsulfat (0,1 M Tris-Azetat, 1% Dodecylsulfat, pH 8)- in Scintillationsgläschen überführt, die 15 ml Scintillationsflüssigkeit enthielten (6 g PBD in 400 ml Äthylenglycol-monomethyläther und 600 ml Toluol). Die Messung erfolgte in einem Packard-Tricarb-Scintillationszähler.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung nach SDS-Gel (bzw. Phenol-Ameisensäure)-Elektrophorese wurden vor der Messung im Scintillationszähler die Gele in 1 x 10 mm dicke Scheiben geschnitten, jedes Scheibchen in 0,5 ml SDS-Puffer (wie oben) bzw. Phenol-Medium (Phenol/Ameisensäure/Wasser 2:1:1; w/v/v) gegeben und das Protein über Nacht bei 60°C eluiert.

3.11.3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Lowry et al. (94) durchgeführt. Die Proteinproben wurden entweder in 2% Dodecylsulfat oder in 80% Ameisensäure, die anschließend mit 5 N NaOH neutralisiert wurde, gelöst. Als Standard diente Serumalbumin vom Rind.

3.11.4. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Reinigung des DCCD-bindenden Proteins wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese in Gegenwart von Phenol-Ameisensäure verfolgt (73). Zur Herstellung der Plattengele wurde eine wässrige Lösung aus 10% Acrylamid, 0,3% Methylenbisacrylamid, Tetramethyläthylendiamin (1 ml/l) und Ammoniumperoxodisulfat (1 g/l) hergestellt und in Gelschablonen (130 x 200 x 3 mm) polymerisiert. Die Gele wurden 48 h in Phenol/Ameisensäure/Wasser (2/1/1; w/v/v) äquilibriert, wobei nach 24h das Medium erneuert wurde. Die Proteinproben wurden in dem gleichen Phenolmedium gelöst. Die Trennung der Polypeptiduntereinheiten wurde in einer horizontalen Plattengel-Elektrophorese bei 300 V ohne Kühlung durchgeführt. Als Elektrodenpuffer diente 10% Essigsäure. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn Cytochrom c, das als Marker auf dasselbe Gel aufgetragen worden war, 6-7 cm gelaufen war. Die Gele wurden 12h mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt (2,5 g/l in Methanol/Wasser/Essigsäure 5:5:1; v/v/v). Als Entfärberlösung diente 10% Essigsäure, anschließend Methanol/Wasser/Essigsäure (5:5:1; v/v/v).

SDS-Gelelektrophorese wurde in analoger Weise durchgeführt (95). Die Gele wurden mit einem SDS-Medium (0,5% SDS, 0,1 M Tris-Azetat, pH 8), das auch als Elektrodenpuffer diente, äquilibriert. Die Proteinprobe wurde in einem 2% SDS-Puffer gelöst (2% SDS, 0,1 M Tris-Azetat, 5% Mercaptoäthanol, pH 8). Die Elektrophorese wurde zuerst mit 30 mA (1-2 h), dann mit 60 mA betrieben. Sie war beendet, wenn Cytochrom c etwa 6 cm gelaufen war. Angefärbt (über Nacht) und entfärbt wurde in der oben beschriebenen Weise.

3.12. Verwendete Materialien

^{14}C -Harnstoff (47 mCi/mMol): Radiochemical Centre, Amersham, England.

ATP, Phenol, HPTCL Fertigplatten Kieselgel 60, Tris, Saccharose, EDTA, PMSF, Cyclohexylamin, Metol, Cholat, Folin, Triton X-100, Äthylenglycol, Perhydrol, Ammoniumheptamolybdat, Citrat, sonstige Salze und Lösungsmittel (p.a.): Merck, AG; Darmstadt.

Cytochrom c (Pferdeherz), Oligomycin, Coomassie Brilliant Blue, Acrylamid, Bisacrylamid, Tetramethyläthylendiamin, SDS, Mercapto-äthanol, BrCN, NBS, CM-Cellulose, Fluorescamin, Dansylchlorid: Serva, GmbH; Heidelberg.

Serum Albumin (Rind): Behringwerke; Marburg.

Ameisensäure, Trichloressigsäure, Methylglykol: Riedel-DeHaen, AG; Seelze Hannover.

Toluol: Aral AG; Ingolstadt.

DC-Fertigfolien F 1700-Micropolyamin: Schleicher&Schüll GmbH; Dassel.

Desoxycholat: Carl Roth OHG; Karlsruhe.

Scintimix III: Packard Instruments; Frankfurt.

Dithiothreitol: Sigma Chemical Co.; St. Louis, USA.

Freud's Adjuvans complete: Difco; Detroit, Michigan, USA.

Sephadex G 25 Coarse: Pharmacia; Upsala, Schweden.

Biogel P-30, Biogel A-0.5m : Bio-Rad; Richmond, Calif. USA.

DEAE-Cellulose: Whatman Ltd.; Maidstone, England.

4. DISKUSSION

4.1. Der mitochondriale ATPase Komplex

Der mitochondriale ATPase Komplex hat membranintegriert die Wirkungsweise eines Energietransformators. Sein katalytischer Teil wandelt Energie aus ATP-Hydrolyse in elektrochemische Arbeit um. Sein Kanal, der sogenannte Membransektor (F_o), ist am Transport von Protonen durch die Membran beteiligt. Im intakten Membrankomplex wird die Passage der Protonen durch einen "Schließmechanismus" kontrolliert, und so kann eine elektrochemische Potentialdifferenz von H^+ ($\Delta \bar{\mu} H^+$) über die Membran aufrechterhalten werden. In umgekehrter Weise ist das Enzym in der Lage, die Energie des Protonengradienten zu benutzen, um in einer gekoppelten Reaktion Protonen zu leiten und ATP zu synthetisieren. Die Funktion und Struktur des ATP-hydrolysierenden Teiles (F_1) mit seinen Untereinheiten ist eingehend erforscht worden. Besonderes Augenmerk hat man deshalb in jüngerer Zeit auf die protonentransduzierende Komponente (F_o) gelegt. Neben einer ungewissen Zahl nicht näher charakterisierten Untereinheiten enthält diese Teilstruktur des Komplexes ein Peptid, das folgende Eigenschaften aufweist:

1. Es bindet irreversibel und spezifisch DCCD;
2. Aufgrund seines extrem hydrophoben Charakters ist es in organischen Lösungsmitteln löslich und läßt sich mit deren Hilfe isolieren.
3. Sein Molekulargewicht liegt im Bereich von 8 000 Dalton.
4. In der Membran liegt es als Oligomer, vermutlich als Hexamer, vor.

4.2. Die Rolle des DCCD-bindenden Proteins im ATPase Komplex

Welche Rolle das DCCD-bindende Protein im Rahmen des gesamten ATPase Komplexes spielt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Seine direkte Beteiligung am Ladungstransfer über die Membran ist jedoch sehr wahrscheinlich. So wurde in Zellen einer ATPase-Mutante von E.coli ein reduzierter, aktiver Transport von Zucker und Aminosäuren in Verbindung mit einer erhöhten Protonenpermeabilität beobachtet.

Nach Behandlung mit DCCD wurde der passive Protonenfluß reduziert und der Transport von Zucker bzw. Aminosäuren erhöht (24,25). Die erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran für Protonen hat zur Folge, daß über der Membran kein elektrochemisches Potential aufgebaut werden kann, das für aktive Transportvorgänge notwendig ist. Nach Modellvorstellungen ist die Protonendurchlässigkeit auf einen nicht mehr schließbaren Protonenkanal zurückzuführen, der durch DCCD wieder geschlossen werden konnte (17).

Einen direkten Zugang zu der Frage nach der Funktion des DCCD-bindenden Proteins fand man in Experimenten, in denen Komponenten des ATPase Komplexes mit Phospholipiden zu Lipoproteinvesikel rekonstituiert wurden.

Das isolierte Proteolipid aus dem thermophilen Bakterium PS3 vermittelte zwar keine Protonenleitung (96), sondern eine weitere Komponente des F_0 war dazu notwendig, doch sind eine Reihe weiterer Experimente beschrieben worden, die für eine direkte Beteiligung an der Protonenleitung sprechen:

Die Proteolipidfraktion aus Salatchloroplasten-extrahiert mit Butanol- zeigte eine lichtabhängige Protonenaufnahme, wenn sie zusammen mit Bacteriorhodopsin in Vesikel eingebaut wurde. Durch Zugabe von DCCD wurde die lichtinduzierte H^+ -Aufnahme gesteigert, indem der H^+ -Kanal durch DCCD geschlossen wurde. Den radioaktiv markierten Inhibitor fand man ausschließlich an der Proteolipidfraktion gebunden (59).

Das Proteolipid- extrahiert mit Chloroform/Methanol aus dem Hefe-Komplex- steigerte die Leitfähigkeit einer planaren Phospholipid-membran. Der Ladungstransport war oligomycinsensitiv (64).

Der protonentransduzierende Membransektor (F_0) aus dem thermophilen Bakterium PS3 besteht aus zwei Arten von Untereinheiten (48): Untereinheit 6 (F_1 -bindendes Protein) und dem Proteolipid. Obwohl Manipulationen an Untereinheit 6, die allein keine H^+ -Transduktions-aktivität besitzt, die Protonenleitung in F_0 nicht beeinflussten, war diese dann durch F_1 nicht mehr hemmbar (48).

So mögen unter physiologischen Bedingungen zusätzliche (wenige)

Komponenten zur vollständigen Funktion notwendig sein, das DCCD-bindende Protein spielt sicherlich die entscheidende Rolle.

4.3. Der molekulare Mechanismus des Protonentransportes in Membranen

4.3.1. Strukturprinzipien von Kanalproteinen

Eine Struktur in der Membran, durch die spezifische Teilchen oder Lösungsmittelmoleküle entlang ihres elektrochemischen Potentialgradienten transportiert werden, nennt man einen Kanal (17). Spezifische Kanäle findet man in jeder lebenden Zelle. Viele sind isoliert und charakterisiert worden (Übersichtsartikel siehe Ref. 17).

Es wird vermutet, daß die Mehrzahl, wenn nicht alle, eine oligomere Struktur aufweisen. Nach Studien an wasserlöslichen Proteinen (97) wurde ein allgemeines Konzept entwickelt, daß Oligomere mit einer symmetrischen Protomerenstruktur, die allosterische Konformationsänderungen zeigen, ihre Affinität durch das Ausmaß ihrer Ligandenbindung kontrollieren. Es ist wahrscheinlich, daß angesichts der komplexen Funktionen von Biomembranen auch einige Kanalproteine allosterische Proteine sind.

Eine weitere Vorstellung (subunit channel theory) beschreibt die Membrantransportproteine als Peptidketten, die durch die ganze Membran hindurchreichen, wobei die hydrophilen Enden außerhalb der Membran, der mittlere hydrophobe Teil in der Phospholipidschicht der Membran liegen (98).

Der Raum zwischen den Untereinheiten dient als Kanal durch die impermeable Membran (98). Der Pump- und Schließmechanismus des Translokationsmechanismus könnte mit allosterischen Wechselwirkungen innerhalb der Untereinheiten erklärt werden. Diese modellartigen Überlegungen müssen noch experimentell belegt bzw. präzisiert werden.

4.3.2. Theorien zum Mechanismus der Protonentranslokation durch die Phospholipidschichten von Membranen

Seit Mitchells Postulat der chemiosmotischen Kopplung bei der mitochondrialen ATP-Bildung (4), sind vermehrt Gedanken entwickelt worden und Modelle darüber aufgestellt worden, wie Protonen durch die Phospholipidschicht transportiert werden können. In diesen Vorstellungen ist das Grundelement eine Kette von Wasserstoffbrücken durch die Membran, die von Seitengruppen eines Proteins bereitgestellt werden. Als mögliche Aminosäurenkandidaten kommen Serin, Threonin, Tyrosin und die Carboxylgruppen der Asparagin-, bzw. Glutaminsäure in Frage. Die Peptidkette muß so gefaltet sein, daß die Ausbildung eines "Protonendrahtes" aus mindestens 20-25 Wasserstoffbrücken möglich ist, um die Membran zu durchlaufen (99). Dabei sind sowohl α -Helices (100) als auch β -Faltblattstrukturen erlaubt.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Beteiligung von Wassermolekülen hydratisierter Proteine als Kettenglieder (99).

Neben diesen theoretischen Überlegungen ist der hypothetische Mechanismus der H^+ -Pumpe Bacteriorhodopsin aus Halobacterium halobium auf realer Grundlage entwickelt worden. Daten der Elektronenmikroskopie, Röntgenstrukturanalysen und Proteinbiochemie haben ein eindrucksvolles Bild geschaffen, das die vollständige Struktur einschließlich funktioneller Gruppen beinhaltet (zusammenfassender Überblick in Ref. 13). In diesem Fall soll, ausgehend von einer lichtreagiblen, protonierten Schiff'schen Base, die Protonen über Protonierung und Deprotonierung basischer und saurer Seitengruppen transportiert werden.

Man kann sich vorstellen, daß auch das Proteolipid der H^+ -ATPase methodisch ähnlich zugänglich ist. Über Gemeinsamkeiten oder gar allgemeinen Prinzipien in beiden Strukturen wird erst die Zukunft entscheiden.

4.4. Die Primärstrukturen DCCD-bindender Proteine

Ein Weg, der Aufklärung von transmembranalen Transportmechanismen einen Schritt näher zu kommen, besteht in der Isolierung eines Kanalproteins, der Bestimmung seiner Primärstruktur, um von dieser ausgehend seine möglichen dreidimensionalen Anordnungen diskutieren zu können. Primärstrukturen von Kanalproteinen sind bisher kaum bekannt. Bis auf Bacteriorhodopsin aus Halobacterium halobium (101), sind nur die Aminosäuresequenzen von DCCD-bindenden Proteinen beschrieben (66).

Die Anreicherung von Kanalproteinen, die mit Enzymen fest assoziiert sind, kann mit Hilfe ihrer Enzymaktivität verfolgt werden. In anderen Fällen wurde das isolierte Protein in funktionelle Membranen eingebaut und Transportaktivitäten gemessen. Während der Isolierung des DCCD-bindenden Proteins wurde die spezifische und irreversible Bindung von DCCD benutzt, um die Anreicherung verfolgen zu können.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, das DCCD-bindende Protein aus einem Organismus zu isolieren, dessen biologischer Verwandtschaftsgrad mit den Spezies *Neurospora* und Hefe, aus denen das DCCD-bindende Protein bereits isoliert und charakterisiert worden ist, möglichst gering ist, um gemeinsame Eigenschaften zu finden, die möglicherweise einen Hinweis auf den molekularen Mechanismus der Protonentranslokation geben.

Die Primärstruktur des DCCD-bindenden Proteins aus vier verschiedenen Organismen ist inzwischen aufgeklärt (66). Ihnen allen ist eine bestimmte Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren gemeinsam. In einem kurzen Teilstück am N-terminalen Ende findet man hydrophile Seitenketten (besonders saure, aber auch basische und neutrale) angehäuft (Abb. 22). Dem folgt ein hydrophobes Segment mit einer Länge von etwa 25 Aminosäuren, das nur von wenigen Serinen und Threoninen (besonders bei Rinderherz) unterbrochen wird. In der Mitte der Polypeptidkette sind wiederum hydrophile Aminosäuren konzentriert (Position 40 bis 55 nach Nummerierung der *Neurospora*-Sequenz in Abb. 22). Der restliche Teil bis zum C-terminalen Ende wird fast ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren gebildet.

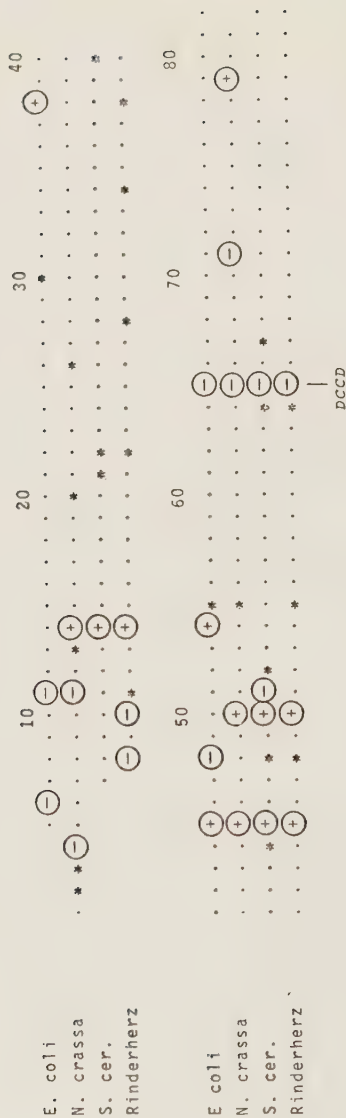


Abb. 22 Verteilung polarer Aminosäuren in der Peptidkette des DCCD-bindenden Proteins

Die Peptidketten der DCCD-bindenden Proteine aus Escherichia coli, Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae und dem Rinderherzen sind mit graphischen Symbolen wiedergegeben. Punkte stehen für unpolare, Kreuze für positiv geladene, Striche für negativ geladene und Sterne für polar ungeladene Aminosäuren. Die Einteilung erfolgte nach Capaldi und Vanderkoi (119). Die Ziffern beziehen sich auf die Sequenz des Neurospora-Proteins. Die Bindungsstelle des DCCD ist zusätzlich vermerkt.

Diese typische Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren könnte auf eine gewisse Anordnung der Polypeptidkette in der Membran zurückzuführen sein. Man kann sich in Anlehnung an die "sub-unit channel theory" zwei hydrophobe Segmente vorstellen, die durch die Doppelmembran reichen, während die polaren Abschnitte entweder in die Wasserphase ragen oder spezifische Kontaktstellen mit den oligomeren untereinander bzw. mit anderen Untereinheiten des ATP-ase Komplexes bilden.

4.5. Die Bindungsstelle und Reaktionsweise des DCCD

Die hydrophobe Sequenz am C-terminalen Ende der Peptidkette wird genau in ihrer Mitte von einer einzigen sauren Seitenkette (Position 65, siehe Abb. 22 und 23) unterbrochen. Dieser Rest (Glutaminsäure, bzw Asparaginsäure bei *E. coli*) ist die Bindungsstelle für den Inhibitor DCCD. Sie ist der einzige saure Rest, der in allen vier untersuchten Sequenzen konserviert wurde.

Über die Bedeutung dieser Aminosäure im Zusammenhang mit seiner Funktion läßt sich in mehrerer Hinsicht spekulieren:

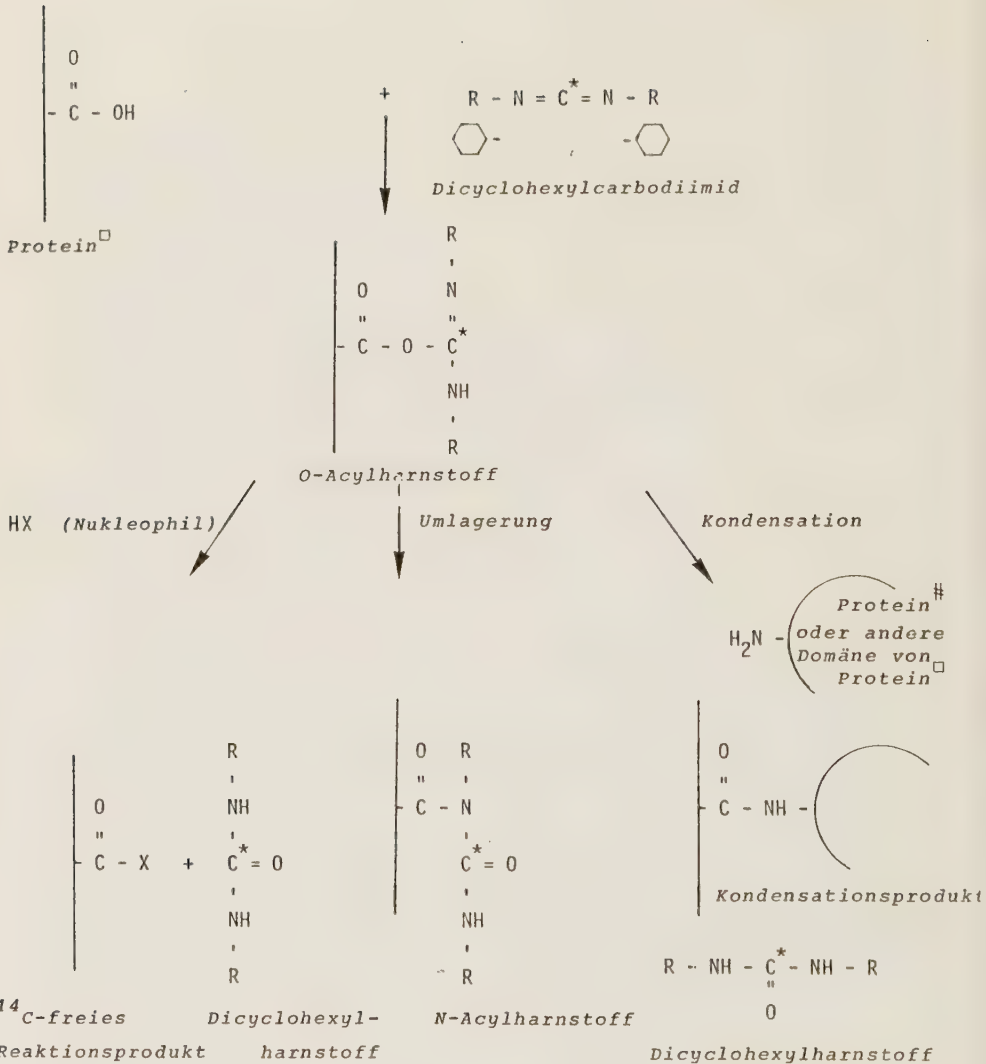
1. Möglicherweise spielt die negative Ladung des Restes eine direkte Rolle im Mechanismus des Protonentransportes. Durch seine Neutralisation ist der Ablauf einer hypothetischen Wirkungskette irreversibel unterbunden.
2. Denkbar wäre auch der Verschluß eines Kanals durch das Carbo-diimidmolekül, indem seine Bindung an das Protein eine für die Funktion notwendige Konformation nicht zuläßt.
3. Die Bindung des Antibiotikums induziert eine koordinierte Änderung des gesamten Oligomers im Sinne einer Schließung des Membrandurchlasses. Die Tatsache, daß schon 0,3 Mol Inhibitor pro Mol Proteolipid genügen, um die ATPase maximal zu hemmen, spricht eher für eine kooperierende Wirkungsweise der Peptide.

Einen Hinweis auf die Bedeutung der Sequenz in der Nähe der DCCD-bindenden Gruppe gibt der Befund, daß die Primärstruktur von DCCD-bindenden Proteinen aus Oligomycin-resistenten Mutanten der Hefe und *Neurospora* im Vergleich zum Wildtyp einen Aminosäureaustausch in unmittelbarer Nachbarschaft des Inhibitor-bindenden Glutaminsäurerestes aufweisen (62,67).

Daß der Hemmechanismus der beiden Hemmstoffe nahe verwandt ist, ist schon lange bekannt (50). Inzwischen weiß man, daß sie den Protonentransport durch die mitochondriale Innenmembran unterbinden (23). Neben diesen funktionellen Aspekten geben die veränderten Primärstrukturen oligomycinresistenter Mutanten und die Tatsache, daß

kovalent an die Mitochondrienmembran fixiertes Oligomycin die Bindungskapazität für DCCD deutlich erniedrigt (102), klare Hinweise, daß beide Verbindungen an dem selben Protein angreifen und eng benachbarte Bindungsstellen besitzen.

Die chemisch reaktive Gruppe des DCCD ist die Carbodiimidgruppe, denn mehrere hydrophobe Carbodiimide mit unterschiedlichen Restgruppen sind in der Lage, die oxidative Phosphorylierung zu hemmen (52). Von den Carbodiimiden weiß man, daß sie stabile Addukte mit mehreren funktionellen Gruppen in einem Protein bilden können (103). Das Reaktionsprodukt von (^{14}C) DCCD mit dem Proteolipid ist so stabil, daß weder Waschen mit Phospholipiden (55,104), noch organische Lösungsmittel oder Detergentien die (^{14}C)-Radioaktivität, auch nicht teilweise, vom Protein trennen können. Ebenso konnte durch diese Behandlung die ATPase-Aktivität nicht wieder hergestellt werden. Dies bedeutet, daß außer dem DCCD-bindenden Protein kein weiteres (^{14}C) DCCD-markiertes Reaktionsprodukt existiert, das für den Hemmeffekt verantwortlich sein kann. Auch können keine lose assoziierten Produkte (d.h. durch Detergentien, organische Lösungsmittel, Ionenstärke etc. abtrennbar) entstanden sein, die für die ATPase-Hemmung verantwortlich wären. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß fest gebundene Produkte mit der Fähigkeit zur Hemmung entstanden sind, die keine (^{14}C)-Radioaktivität enthalten, z.B. durch eine Kondensationsreaktion eines O-Acylharnstoffes mit einer nucleophilen Gruppe (103). Außerdem muß berücksichtigt werden, daß das primäre Reaktionsprodukt, ein O-Acylharnstoff, sowohl zu einem stabilen N-Acylharnstoff, der (^{14}C)-Radioaktivität enthält, als auch zu einem intramolekularen Kondensationsprodukt, frei von (^{14}C)-Radioaktivität, führen kann. Denkbare Reaktionsweisen des DCCD sind im folgenden Schema zusammengefaßt:



$\text{C}^* : ^{14}\text{C}$

Die primäre Bindung von DCCD ist zur Hemmung notwendig, dies kann man aus dem Verhalten von DCCD-resistenten *E.coli*-Mutanten schließen, die die Fähigkeit zur Bindung von DCCD verloren haben und deren ATPase durch DCCD nicht mehr hemmbar ist (105).

Die Frage, ob unter den Proteolipiden innerhalb eines ATPase Komplexes unterschiedliche Reaktivitäten für den Inhibitor bestehen, kann nicht beantwortet werden. Die Bindungskurve (Abb. 2) liefert dazu keinen Anhaltspunkt. In *Neurospora crassa* kann das DCCD-bindende Protein bei hohen (^{14}C) DCCD Konzentrationen mehr als 100 nMol DCCD pro mg Proteolipid binden. Dieser Wert nähert sich einer stöchiometrischen Reaktion von 1:1 (DCCD:Peptid) (55).

4.6. Homologien in den Primärstrukturen der DCCD-bindenden Proteine aus verschiedenen Spezies

Der Vergleich der Primärstrukturen der drei mitochondrialen Proteine aus Rinderherz, Neurospora und Hefe zeigt Homologien über weite Strecken der Peptidkette (Abb. 23). 32 Positionen sind von gleichen Aminosäuren besetzt. 40 Positionen sind in dem Protein aus Neurospora und Hefe identisch. Ein noch höheres Maß an Homologie besteht zwischen Rinderherz und Hefe mit 46 identischen Positionen, obwohl diese drei Organismen phylogenetisch sehr weitläufige Verwandte sind (Tabelle 8). Im Falle des Cytochrom c wurde ein ähnlich hoher Grad an Homologie zwischen diesen Organismen festgestellt (106). Im Vergleich der drei mitochondrialen Polypeptide weisen die polaren N-terminalen Sequenzen relativ große Unterschiede auf. Die hydrophoben C-Termini von Hefe und Rinderherz ähneln sich dagegen sehr. Nur das Neurospora-Protein besitzt am Ende zwei polare Reste. Im Gegensatz dazu ist das polare Segment in der Mitte der Kette bemerkenswert homolog. Auffallend ist die identische Position der drei basischen Aminosäuren (Position 14, 45 und 50, siehe Abb. 22 bzw. 23) und einer sauren Gruppe (Position 55).

In einem weitaus höheren Maße sind jedoch die hydrophoben Abschnitte (Positionen 16-40 und 53-80) der Sequenz konserviert. Dieser unerwartete Befund könnte bedeuten, daß diese hydrophoben Aminosäuren nicht nur die Aufgabe haben, eine lipophile Kontaktstelle zur Lipidphase zu bilden, sondern, daß sie eine spezifischere Rolle im Enzymkomplex spielen.

Aus dem Vergleich der Sequenzen der mitochondrialen Polypeptide mit dem aus E.coli geht klar hervor, daß die Proteine homolog sind. 14-18 Positionen sind identisch zu jeweils einem der mitochondrialen Proteine, 6 Positionen in allen vier Organismen. Der hydrophile Mittelteil und die DCCD-bindende Asparaginsäure in Position 65 unterstreichen eindeutig den homologen Charakter der bakteriellen mit den mitochondrialen DCCD-bindenden Proteinen und somit des gesamten ATPase Komplexes. Dies überrascht nicht angesichts großer Ähnlichkeiten in Funktion und Zusammensetzung seiner Untereinheiten. Daraus könnte man schließen, daß dieses hochkomplizierte Enzymprotein schon sehr

E. coli (66)	10	f _M E N L N M D L L Y M A A A V M M G L A A I	20	G A A T G I G I L G G K F L	30	G A A T G I G I L G G K F L	40	L
N. crassa (66)		Y S S E I A Q A M V E V S		K I N L G M G S A A I		G L T G A G I G I G L V F A A L L		L
S. cer. (66)		f _M Q L V L A A K V I G A G I S T I G L L G A G I G I A I V F A A L T						
Rinderherz		D I D T A A K F I G A G A A T V G V A G S G A G I G T V F G S L I						
E. coli	50	Q G A A R Q P D L I P L L R T Q F F I V M G L V D I A	60	I P M I A V G L G L Y V M A V A	70	G L F D L M V A L M A K F T	80	V A
N. crassa		N G V A R N P A L R G Q L F S Y A I L G F A F V E A I		G L F D L M V A L M A K F T				
S. cer.		N G V S R N P S I K D T V F P M A I L G F A L S E A T		G L F C L M V S F L L L F G V				
Rinderherz		I G Y A R N P S L K Q Q L F S Y A I L G F A L S E A M		G L F C L M V A F L I L F A M				

DCCD

Abb. 23 Primärstrukturen der DCCD-bindenden Proteine aus Escherichia coli, Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae und dem Rinderherzen

Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode wiedergegeben, dessen Übersetzung im Abschnitt 6 zu finden ist. Die Nummerierung folgt der Sequenz des Peptids aus Neurospora. Positionen, die innerhalb der mitochondrialen Ketten oder in allen vier Proteinen identisch besetzt sind, wurden umrandet. Die DCCD-bindende Gruppe ist zusätzlich hervorgehoben.

T a b e l l e 8

Identische Positionen von Aminosäuren in den Primärstrukturen der DCCD-bindenden Proteine aus Hefe (Saccharomyces cerevisiae), Neurospora crassa, dem Rinderherzen und Escherichia coli

Anzahl der identischen Positionen				
	S. cer.	N.cr.	RiHe	E.coli
Saccharomyces cerevisiae	76	40	46	11
Neurospora crassa	52	81	40	17
Rinderherz	59	52	75	14
Escherichia coli	14	22	18	78
Identische Positionen in Prozent*				

* die Prozentangaben beziehen sich auf eine durchschnittliche Aminosäureanzahl von 77,5

früh in der Evolution entwickelt worden ist.

Funktionelle Aussagen über die Bedeutung der einzelnen Sequenzabschnitte bzw. einzelner Aminosäuren zu treffen, wäre allein auf der Grundlage der Primärstrukturen verfrüht. Doch sollte man sich nicht scheuen, erste Hinweise aufzugreifen.

Es fällt auf, daß in den mitochondrialen Proteinen die Positionen der drei basischen und eines sauren Restes (Bindungsstelle für DCCD) nicht variieren, während die Verteilung polar ungeladener Aminosäuren weniger signifikant ist. Auch die Gesamtzahl geladener Aminosäuren (5-8) variiert weniger stark als die polar ungeladener (3-10). Möglicherweise spielen Letztere eine untergeordnete Rolle, was bemerkenswert ist, wenn man die Protonenleitungstheorie von Nagle und Morowitz (99) in Betracht zieht (siehe 4.3.2.). Sicher reichen die vorhandenen polaren Seitenketten eines Proteolipids nicht aus, um eine Protonenleitung aus Wasserstoffbrücken über die Membran zustande zu bringen.

Drei einzelne Aminosäuren sind zusätzlich hervorzuheben, das sind Arg 45, Pro 47 und Glu 65 (Asp 65) (Abb. 23), die in allen vier untersuchten Spezies invariant besetzt sind. Die erste gewinnt Bedeutung durch den Befund von Sone et al. (108), daß die chemische Modifikation eines Arginins oder Tyrosins des protonenleitenden Sektors des ATPase Komplexes im thermophilen Bakterium PS3 die H^+ -Überleitung hemmt. Arg 45, als einziger invarianter Rest der möglichen Kandidaten, steht daher an erster Stelle. Von Prolinen weiß man, daß sie den Aufbau einer α -Helix stören und eine Knickstelle in der Kette bilden. Spielt Pro 47 als durchweg konservierter Rest eine Rolle bei der Ausbildung der Tertiärstruktur? Über die mögliche Bedeutung der DCCD-bindenden Stelle (Glu 65) ist bereits ausführlich geschrieben worden(4.5.).

Zuletzt sind noch die Glycine zu erwähnen. Allein sieben der zehn Glycinreste in den mitochondrialen Peptiden sind an identischen Positionen zu finden, drei überlappen mit der E.coli-Proteinkette. Glycin ist die kleinste Aminosäure und bildet bewegliche Scharniere im Proteingerüst. Auch hier erhebt sich die Frage nach der Aufgabe bei Ausbildung der Proteinkonformation.

4.7. Biogenese der DCCD-bindenden Proteine

So sehr die strukturelle Einheitlichkeit der DCCD-bindenden Proteine beeindruckt, so sehr verblüfft aus diesem Grund die Antwort auf die Frage nach dem Translationsort:

Wie bei der Biosynthese einiger Komplexe der Atmungskette (Cytochromoxidase (95), Cytochrom b (109)), so beteiligt sich auch an der Synthese mitochondrialen ATPase Komplexes ein mitochondrien-eigenes Transskriptions- und Translationssystem. Vier Untereinheiten des Komplexes aus der Hefe, darunter das Proteolipid, werden an mitochondrialen Ribosomen gebildet (110). In Neurospora crassa sind zwei Untereinheiten mitochondrialen Ursprungs (111), das Proteolipid jedoch wird im Kern codiert und an cytoplasmatischen Ribosomen in Form einer Vorstufe (112) synthetisiert. Chloramphenicol-resistente und Cycloheximid-sensitive Markierung des Proteolipids aus Aspergillus nidulans nach Einbau radioaktiver Aminosäuren zeigten, daß dieses Protein im Cytoplasma synthetisiert wird (113). In Rattenlebermitochondrien wurde ein Chloroform/Methanol-lösliches Produkt mitochondrialer Proteinsynthese identifiziert, das mit dem DCCD-bindenden Protein identisch sein soll (114).

Über den Syntheseort des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen ist nichts bekannt. Der N-Terminus des Proteins (Asp) könnte für einen nukleären Ursprung sprechen, da der bakterielle Peptidketten-Initiator N-formyl-methionyl-tRNS in eukaryotischen Zellen auch in Mitochondrien verwendet wird (115). Dies trifft für das Proteolipid der Hefe zu, sein N-Terminus ist N-formyl-Methionin. Allerdings kann eine limitierte Proteolyse im Falle des Rinderherzens nicht ausgeschlossen werden.

4.8. Die Quartärstruktur des DCCD-bindenden Proteins

Es ist im Rahmen dieser Arbeit schon mehrfach darauf hingewiesen worden, daß das Proteolipid des protonentransduzierenden ATPase Komplexes vermutlich eine oligomere Struktur besitzt. Vor dem Hintergrund der ebenfalls bereits erwähnten, generellen Vorstellungen über Kanalproteine (4.3.1.) und der bereits bekannten Struktur des Bac-

teriorhodopsins (13), das als Trimer zwei konzentrische Kreise um eine freie Pore bilden soll, gewinnt die Frage nach der Quartärstruktur des Proteolipids an Bedeutung.

Auch wenn direkte Beweise der Röntgenstrukturanalyse fehlen, liegen doch zahlreiche Beweise vor, daß das DCCD-bindende Protein eine oligomere Struktur besitzt:

1. Der molare DCCD-Gehalt (Mol/Mol Protein) des gereinigten Proteolipids aus dem Rinderherzen ist im Vergleich zum ATPase Komplex sechs- bis siebenfach erniedrigt.
2. Im Butanol-extrahierten Protein aus Salatchloroplasten werden 0,17 Mol DCCD kovalent an ein Mol Proteolipid gebunden, unter Bedingungen, die zur maximalen Hemmung der ATPase-Aktivität ausreichen (116).
3. Exakte Berechnungen des Gehaltes an Proteolipid in der ATPase aus Neurospora crassa in Prozent des gesamten ATPase-Proteins, konnten aus der Verteilung einer homogenen (^3H) Leucin-Markierung aufgrund des Leucingehaltes der Untereinheit und des gesamten Komplexes aufgestellt werden, nachdem in der SDS-Gelelektrophorese das 8 000 Dalton Protein von den übrigen Peptiduntereinheiten getrennt wurde. Nach solchen Berechnungen besitzt der ATPase-Komplex in Neurospora fünf bis sieben Moleküle des DCCD-bindenden Moleküls (55).
4. Die Stöchiometrie des DCCD-bindenden Proteins in dem ATPase Komplex aus dem thermophilen Bakterium PS3 ist vier bis sechs in Bezug auf F_1 (96).

Diese Ergebnisse lassen keinen Zweifel, daß die Proteolipid-Untereinheit im Enzymkomplex als Oligomer, wahrscheinlich als Hexamer organisiert ist.

4.9. Anreicherung des DCCD-bindenden Proteins aus dem Rinderherzen

Verschiedene Methoden sind bekannt, aus Membranen hydrophober Proteine zu extrahieren.

Extraktionen mit Detergentien wie Triton X-100, Cholat und Desoxycholat sind heute weitverbreitete Standardmethoden zur Darstellung cytochromhaltiger Proteinkomplexe der mitochondrialen Innenmembran (75,95,117). Aber auch organische Lösungsmittel fanden Anwendung. Sie wurden vor allem eingesetzt, um Lipide von Membranproteinen zu trennen, da die meisten Proteine in organischen Lösungsmitteln denaturiert werden. Einige Membranproteine sind darin jedoch stabil. Große Proteine, z.B. die F_1 -ATPase von photosynthetischen Bakterien, können aus Acetonpulver extrahiert werden (118). Andere, wie die Succinatdehydrogenase, werden mit Hilfe von 1-Butanol, das Enzym II A (ein Zucker-Translokator) mit einem Gemisch aus 1-Butanol/Harnstoff/Wasser extrahiert. Chloroform-Methanolbehandlung (52,56), Chloroform-Methanol mit vorherigem Auswaschen der Phospholipide (55), sind zur Gewinnung des DCCD-bindenden Proteins angewandt worden. Die Effizienz ist von Organismus zu Organismus verschieden. Für das Rinderherzproteolipid erwies sich am geeignetsten eine direkte Extraktion mit Chloroform/Methanol ohne Vorbehandlung, mit der ca. 40% der gebundenen (^{14}C) DCCD-Radioaktivität gewonnen werden konnte.

Aus Rinderherzmitochondrien wurden zusammen mit dem DCCD-bindenden Protein weitere, mit (^{14}C) DCCD nicht markierte Proteine extrahiert. Daher wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt notwendig. DEAE-Cellulose Chromatographie konnte erfolgreich zur Isolierung des DCCD-bindenden Proteins aus E.coli angewandt werden (57). Diese Methode war zur Reindarstellung des Rinderherzproteolipids nicht geeignet, da dieses Protein an die DEAE-Cellulose nicht gebunden wurde. Aus diesem Befund wurde die Annahme abgeleitet, daß das DCCD-bindende Protein unter den Bedingungen entweder eine neutrale oder positive Gesamtladung besitzt. Deshalb schien die CM-Cellulose Chromatographie ein geeignetes Mittel zur Isolierung des Proteins. Mit dieser Methode konnte es schließlich in homogener Form dargestellt werden. Die Anwesenheit von Wasser während der Chromatographie veränderte das Elutionsverhalten der Proteine entschieden, da der wässrige An-

teil die Dissoziation des Ammoniumazetats ermöglichte und somit definierte Ionenverhältnisse in der Elutionsflüssigkeit gegeben waren. Dies erklärt die Beobachtung, daß zehnfach höhere Ammoniumazetatkonzentrationen notwendig waren, um das DCCD-bindende Protein zu eluieren, wenn die Chromatographie in Chloroform/Methanol ohne Wasser durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen wurden zusammen mit der Proteolipidfraktion weitere unspezifische Proteine eluiert. Aber nicht nur Ionenkonzentrationen, auch Lösungseigenschaften der Proteine scheinen sich durch die wässrige Komponente zu verändern. Dieses Charakteristikum wurde benutzt, um erste DCCD-bindende Proteine zu charakterisieren (52).

Das DCCD-modifizierte und nicht modifizierte Proteolipid wurde im Gegensatz zur DEAE-Cellulose Chromatographie des E.coli-Proteolipids (57) bei gleicher Ionenstärke eluiert, obwohl durch die Bindung von DCCD eine negative Gruppe (γ -Carboxylgruppe eines Glutaminsäurerestes) neutralisiert wird und die modifizierte Form dadurch stärker an das Austauschergel hätte gebunden werden müssen.

Die bei höherer Ionenstärke eluierten Proteinfractionen (Abb. 8) enthielten keine (^{14}C) DCCD-Radioaktivität. Nach Phenol/Ameisensäure Gelelektrophorese dieser Fractionen (Abb. 8) konnte keine Bande ausgemacht werden, die dem DCCD-bindenden Protein entspricht. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich modifizierte und nicht modifizierte Form teilweise während der Chromatographie entmischten, da ca. 50% der (^{14}C) DCCD-Radioaktivität und 50-60% des Gesamtproteins an dem Austauschergel gebunden blieben.

4.10. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Reindarstellung von extrem hydrophoben Proteinen entwickelt. Der hohe Reinheitsgrad der Proteinfraktionen erlaubt weiterführende Studien, die in diesem speziellen Fall bedeutend sind im Zusammenhang mit dem Mechanismus der Protonenleitung in energietransformierenden Prozessen an Membranen. Die allgemeine Verwendbarkeit für homologe Proteine aus anderen Spezies und die problemlose Durchführbarkeit sind wichtig für Vergleichsstudien.

Die Primärstruktur des DCCD-bindenden Proteins hat Modellcharakter für Kanalproteine allgemein. Mit ihrer genauen Kenntnis lassen sich gezielt chemische Reagenzien einsetzen, die selektiv Aminosäurenreste modifizieren und so die Funktion des Proteins beeinflussen. Oberflächenreagenzien mit definiertem Wirkungsradius geben Aufschluß über die topographische Lage des Proteins in der Membran. Um erste Hinweise über helikale oder Faltblattstrukturanteile zu erhalten, ist die Primärstruktur von fundamentaler Bedeutung. Ein Vergleich der Primärstrukturen aus verschiedenen Spezies erlaubt Aussagen über die für die Funktion essentiellen Aminosäurenreste, indem konservierte Positionen bestimmt werden.

Das Ziel dieser Bemühungen ist es, den Mechanismus der Protonenleitung im energietransformierenden ATPase Komplex besser zu verstehen, und somit einen Beitrag zur Aufklärung der membrangebundenen Energiekonservierung zu leisten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Membranen aus Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien, die am Prozeß der Energietransformation beteiligt sind, binden kovalent und irreversibel das Carbodiimid DCCD. Dadurch werden sowohl ATP-Hydrolyse als auch Protonentransport unterbunden. Mit Hilfe des radioaktiv markierten Inhibitors (^{14}C)DCCD) konnte gezeigt werden, daß bei Inhibitorkonzentrationen, die gerade ausreichen, um die ATPase-Aktivität zu hemmen, die Bindung spezifisch ist. Als spezifische Bindungsstelle wurde eine Proteolipid-Untereinheit des ATPase Komplexes (ATP-Synthetase) identifiziert, der - membranintegriert - als ATP-getriebene H^+ -Pumpe arbeitet. Der Membranfaktor des Enzymproteins, der fest in der Phospholipidschicht der Membran verankert ist, stellt dabei einen Protonenleiter dar. Die DCCD-bindende Proteolipid-Untereinheit bildet darin als Hexamer wahrscheinlich einen Protonenkanal. Die vorliegende Arbeit beschreibt Isolierung und Primärstruktur dieses Proteins.

Die Extraktion des DCCD-bindenden Proteins aus submitochondrialen Partikeln aus Rinderherzen und Rinderleber gelang mit Hilfe von neutralem Chloroform/Methanol. Die Reinigung erfolgte durch CM-Cellulose Chromatographie in Gegenwart von Chloroform/Methanol/Wasser.

Als analytischer Nachweis und als Reinheitskontrolle diente die Gel-Elektrophorese in Gegenwart von Phenol/Ameisensäure. Dieses Verfahren wurde der allgemein üblichen Methode der SDS-Gelelektrophorese vorgezogen, da besonders das Proteolipid aus dem Rinderherzen in Dodecylsulfat zur Aggregation neigt, was zu falschen Rückschlüssen hinsichtlich des Molekulargewichts und Reinheitsgrades führen könnte.

Aminosäureanalysen des hochgereinigten Proteins kennzeichnen seinen extrem hydrophoben Charakter (Polarität 23%) mit hohen Anteilen von Alanin, Glycin, Leucin und einem außergewöhnlich niedrigen Gehalt an basischen Aminosäuren. Diese Zusammensetzung erklärt die für ein Protein ungewöhnliche Eigenschaft der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln.

Die aus Rinderlebermitochondrien gewonnene Proteolipidfraktion hat in vieler Hinsicht gleiche Eigenschaften wie das Protein aus dem Herzen. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob die Gründe für die geringfügigen Unterschiede in den Aminosäureanalysen im Methodischen liegen oder ob organspezifische Unterschiede in der Primärstruktur bestehen.

Die Aufklärung der Primärstruktur wurde mit dem Ziel betrieben, im Vergleich mit den Sequenzen von Proteolipiden aus anderen Quellen über die phylogenetisch konservierten Sequenzabschnitte bzw. Aminosäurenreste erste Hinweise zur Funktion der Protonentranslokation zu erhalten. Die vollständige Aminosäuresequenz ergab sich nach Sequenzierung der ungespaltenen Peptidkette und von Bruchstücken nach Spaltung mit Cyanogenbromid und N-Bromsuccinimid an einem festen Träger (Festphasensequenzierung).

Die Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren in der Peptidkette gibt ein charakteristisches Bild: Am N-terminalen Ende und in der Kettenmitte häufen sich hydrophile Reste. Die Abschnitte dazwischen, besonders das C-terminale Drittel, werden von hydrophoben Aminosäuren gebildet. Diese Sequenz apolarer Seitenketten wird durch einen sauren Rest (Glutaminsäure) unterbrochen, der als DCCD-bindende Gruppe identifiziert wurde.

Ein Vergleich mit den Primärstrukturen der DCCD-bindenden Proteine aus Neurospora crassa, Hefe und Escherichia coli zeigt, daß die Proteine homolog sind. So sind 40 bzw. 45 Positionen im Peptid aus Neurospora bzw. Hefe mit identischen Aminosäuren besetzt. Auch zu dem Proteolipid aus E.coli bestehen eindeutige Hinweise auf Homologien.

6. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Aminosäuren

Dreibuchstaben Code	Einbuchstaben Code	
Asp	D	Asparaginsäure
Asn	N	Asparagin
Asx	B	Asp oder Asn
Thr	T	Threonin
Ser	S	Serin
Glu	E	Glutaminsäure
Gln	Q	Glutamin
Glx	Z	Glu/Gln
Pro	P	Prolin
Gly	G	Glycin
Ala	A	Alanin
Cys	C	Cystein
Val	V	Valin
Met	M	Methionin
MSO		Methioninsulfoxid
MSN		Methioninsulfon
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Phe	F	Phenylalanin
Tyr	Y	Tyrosin
His	H	Histidin
Trp	W	Tryptophan
Lys	K	Lysin
Arg	R	Arginin
Hse		Homoserin

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CAT	Carboxyatractylosid
CM	Carboxymethyl
Cyt c	Cytochrom <u>c</u>
Dansyl	Dimethylaminonaphthalinsulfonsäure

DCCD	N,N' Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	Diäthylaminoäthyläther
DITC	p-Phenylendiisothiocyanat
DOC	Desoxycholät
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NBS	N-Bromsuccinimid
OS-ATPase	Oligomycin sensitive Adenosintriphosphatase
OSCP	Oligomycin-Sensitivity-Conferring-Protein
P _a	anorganisches Phosphat
PL	Proteolipid
PMSF	Phenylmethan-Sulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMP	Submitochondriale Partikel
ST	Saccharose-Tris
SET	Saccharose-EDTA-Tris
TEA	Tris-EDTA-ATP
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Slater, E.C. (1953) *Nature* 172, 975-978.
- (2) Boyer, P.D., Cross, R.L. and Momsen, W. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)* 70, 2837-2839.
- (3) Boyer, P.D. (1965) in: *Oxidases and Related Redox Systems* (T.E. King et al. eds.) Wiley, New York, pp. 994-1008.
- (4) Mitchell, P. (1961) *Nature* 191, 144-148.
- (5) Mitchell, P. and Moyle, I. (1965) *Nature* 208, 147-151.
- (6) Jagendorf, A.T. and Uribe, E. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)* 55, 170-177.
- (7) Reich, R.A., Moyle, I. and Mitchell, P. (1966) *Nature* 212, 257-258.
- (8) Hinkle, P.C. (1973) *Fed. Proc.* 32, 1988-1992.
- (9) Harold, F.M. (1972) *Bacteriol. Rev.* 36, 172-230.
- (10) Racker, E. and Stoeckenius, W. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 662-663.
- (11) Mitchell, P. (1974) *FEBS Lett.* 43, 189-194.
- (12) Kagawa, Y. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 265, 297-338.
- (13) Koslov, A. and Skulachev, V.P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 463, 29-89.
- (14) Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H., Okamoto, H. and Kagawa, Y. (1976) *J. Membr. Biol.* 30, 121-134.
- (15) Kagawa, Y. and Racker, E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5477-5487.
- (16) Tzagoloff, A. (1976) in: *The Enzymes of Biological Membranes* Vol. 4 (A. Martonosi ed.) John Wiley and Sons, London, New York pp. 103-124.
- (17) Kagawa, Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 505, 45-93.
- (18) Kagawa, Y. and Racker, E. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2467-2474.
- (19) Bulos, B. and Racker, E. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3891-3900.

- (20) Beechey, R.B., Holloway, C.T., Knight, I.G. and Robertson, A. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23, 75-80.
- (21) Beechey, R.B., Robertson, A.M., Holloway, C.T. and Knight, I. (1967) *Biochemistry*, 6, 3867-3879.
- (22) Hinkle, P.C. and Horstman, L.L. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6024-6028.
- (23) Racker, E. (1972) *J. Membr. Biol.* 10, 221-235.
- (24) Patel, L., Schuldiner, S. and Kaback, H.R. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)* 72, 3387-3391.
- (25) Rosen, B.P. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 53, 1289-1296.
- (26) Downie, I.A., Gibson, F. and Cox, G.B. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 103-131.
- (27) Penefsky, H.S. (1974) *The Enzymes Vol. X*, (P.D. Boyer ed.) Academic Press, N.Y. pp. 375-394.
- (28) Senior, A.E. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 301, 249-277.
- (29) Pedersen, P.L. (1975) *Bioenergetics* 6, 243-275.
- (30) Sebald, W. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 463, 1-27.
- (31) Tzagoloff, A. and Meagher, P. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 7328-7336.
- (32) Swanljung, P. and Frigeri, L. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 283, 391-394.
- (33) Tzagoloff, A., Byington, K.H. and McLennan, D.H. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 2405-2412.
- (34) Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. and Racker, E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 3322-3329.
- (35) Penefsky, H.S., Pullman, M.E. Datta, A. and Racker, E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 3330-3336.
- (36) Spitsberg, V. and Haworth, R. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 492, 237-240.
- (37) Kagawa, Y., Sone, N., Yoshida, M. Hirata, H. and Okamoto, H. (1976) *J. Biochem.* 80, 141-151.

- (38) Kagawa, Y. and Racker, E. (1966)
J. Biol. Chem. 241, 2475-2482.
- (39) Fernandez-Moran, H. Oda, T., Blair, P.V. and Green, D.E.
(1964) J. Cell. Biol. 22, 63-100.
- (40) Vail, W.I. and Riley, R.K. (1971) Nature 231, 525-527.
- (41) Verschoor, G.I. van der Sluis, P.R. and Slater, E.C. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 462, 438-449.
- (42) Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 74, 936-940. (1977)
- (43) Pullman, M. E. and Monroy, G.C. (1963)
J. Biol. Chem. 238, 3762-3769.
- (44) Mc Lennan, D. and Tzagoloff, A. (1968) Biochemistry 7,
1603-1610.
- (45) Tzagoloff, A. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1545-1551.
- (46) Tzagoloff, A. McLennan, D. H., Byington, K.H. (1968)
Biochemistry 7, 1596-1602.
- (47) Sierra, M.F. and Tzagoloff, A. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 70, 3155-3159.
- (48) Sone, N., Yoshida, M. Hirata, H. and Kagawa, Y. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 75, 4219-4223.
- (49) Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., Yoshida, M. and Kagawa, Y.
(1977) J. Biol. Chem. 252, 6125-6131.
- (50) Robertson, A.M., Holloway, C.T., Knight, I.G. and Beechey, R.B.
(1966) Biochem. J. 108, 445-456.
- (51) Kagawa, Y. and Racker, E. (1966) J. Biol. Chem. 241,
2461-2466.
- (52) Cattell, K.I., Lindop, C.R., Knight, I.G. and Beechey, R.B.
(1971) Biochem. J. 125, 169-177.
- (53) Stekhoven, F.S., Waitkus, R.F. and van Moerkerk, Th.B.
(1972) Biochemistry 11, 1144-1150.
- (54) Azzi, A., Bragadin, M.A. Tamburro, A.M. Santato, M.
(1973) J. Biol. Chem. 248, 5520-5526.

- (55) Sebald, W., Graf, T. and Lukins, H.B. (1979)
Eur. J. Biochem. 93, 587-599.
- (56) Fillingame, R.H. (1975) J. Bacteriol. 124, 870-883.
- (57) Fillingame, R.H. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6630-6637.
- (58) Altendorf, K. (1977) FEBS Lett. 73, 271-275.
- (59) Nelson, N. Eytan, E., Notsani, B.E., Sigrist, H., Sigrist-Nelson, K. and Gittler, C. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 74, 2375-2378.
- (60) Sigrist, H., Sigrist-Nelson, K. and Gittler, C. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 74, 178-184.
- (61) Sebald, W., Graf, T. and Wild, G. (1976) in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Th. Bücher et al. eds.) Elsevier/North-Holland. Amsterdam, pp. 167-174.
- (62) Wachter, E., Sebald, W. and Tzagoloff, A. (1977) in: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (W. Bandlow et al. eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 441-449.
- (63) Graf, T. and Sebald, W. (1978) FEBS Lett. 94, 218-222.
- (64) Criddle, R.S., Packer, L. and Shieh, P. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 74, 4306-4310.
- (65) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. (1957)
J. Biol. Chem. 226, 497-509.
- (66) Sebald, W. and Wachter, E. (1978) in: Energy Conservation in Biological Membranes (Schäfer, G. & Klingenberg, M. eds.) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 228-236.
- (67) Sebald, W., Sebald-Althaus, M. and Wachter, E. (1977) in: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (W. Bandlow et al. eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 443-440.
- (68) Kagawa, Y. and Racker, E. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2467-2474.
- (69) Serrano, R. Kanner, B.I. and Racker, E. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 2453-2461.

- (70) Berden, I.A. and Voorn-Brouwer, M.M. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 501, 424-439.
- (71) Norling, B., Glaser, E. and Ernster, L. (1978) in: Conjugation
Reactions in Drug Biotransformation (Aitio, A. ed.)
Elsevier, North-Holland, Biomed Press, Amsterdam pp. 504-515.
- (72) Ludwig, B. and Capaldi, R.A. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 1159-1167.
- (73) Sebald, W. (1969) Dissertation der Fakultät für Chemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- (74) Sebald, W. and Wild, G. (1979) Meth. Enzymol. 56, 50-57.
- (75) Steffens, G. und Buse, G. (1976)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1125-1137.
- (76) Machleidt, W. and Wachter E. (1977) Meth. Enzymol. 47,
263-277.
- (77) Wachter, E. and Sebald, W. Manuskript in Vorbereitung
- (78) Werhahn, R. (1977) Diplomarbeit, Fachbereich Chemie der
Ludwig-Maximilian-Universität München
- (79) Laursen, R. Horn, M.I. and Bonner, A.G. (1972)
FEBS Lett. 21, 67-70.
- (80) Witkop, B. (1961) Advan. Protein Chem. 16, 221-321.
- (81) Edelhoch, H. (1967) Biochemistry 6, 1948-1954.
- (82) Horn, M. I. and Laursen, R. A. (1973) FEBS Lett. 36, 285-288.
- (83) Green, D.E. and Ziegler, D.M. (1963) Meth. Enzymol. 6,
416-424.
- (84) Beechey, R.B., Hubbard, S.A., Linnett, P.E., Mitchell, A.D.
and Munn, E.A. (1975) Biochem. J. 148, 535-537.
- (85) Rouser, G., Kritchevsky, G. Yamamoto, A., Simon, G., Galli, C.
and Bauman, A.I. (1969) Meth. Enzymol. 14, 272-317.
- (86) Amiard, G., Heynes, R. and Velluz, C. (1958) Chem. Abstr. 52,
426.
- (87) Walther, H. (1963) Chem. Abstr. 58, 2382.

- (88) Fahmy, A.R., Niederwieser, A., Patalu, G. und Brenner, M.
(1961) *Helv. Chim. Acta* 44, 2022-2026.
- (89) Vanderkerckhove, J., Montagu, M. V. (1974)
Eur. J. Biochem. 44, 279-288.
- (90) Reindel, F. und Hoppe, W. (1954) *Chem. Ber.* 87, 1103-1107.
- (91) Gray, W.R. (1972) *Meth. Enzymol.* 25, 121-138.
- (92) Hirs, C.H.W. (1967) *Meth. Enzymol.* 11, 59-62.
- (93) Tzagoloff, A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5027-5033.
- (94) Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.
(1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- (95) Sebald, W., Machleidt, W. and Otto, J. (1973)
Eur. J. Biochem. 38, 311-324.
- (96) Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1979)
J. Biochem. 85, 503-509.
- (97) Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J.-P., (1965)
J. Mol. Biol. 12, 88-118.
- (98) Singer, S.J. (1974) *Ann. Rev. Biochem.* 43, 805-833.
- (99) Nagle, J.F. and Morowitz, H.F. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 75, 298-302.
- (100) Nagle, J.F., Mille, M. and Morowitz, H.J. (1979)
Biophys. J. 25, 48a.
- (100) Dunker, A.K. (1978) *J. Theor. Biol.* 72, 4-16.
- (101) Ovchinnikov, Yu.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Yu.,
Kiselev, A.V. and Lobanov, N.A. (1979) *FEBS Lett.* 100,
219-224.
- (102) Criddle, R.S., Arulanandan, C., Edwards, Johnston, R.,
Schorf, S. and Enns, R. (1976) in: *Genetics and Biogenesis
of Chloroplasts and Mitochondria* (Th. Bücher et al. eds.)
Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 151-157.
- (103) Carraway, K.L. and Koshland, D.E.jr. (1972)
Meth. Enzymol. 25, 616-623.
- (104) Holloway, C.T., Robertson, A.M., Knight, I.G. and Beechey, R.B.
Biochem. J. 100, 79.
(1966)

- (105) Altendorf, K. and Zitzmann, W. (1975)
FEBS Lett. 59, 268-272.
- (106) Fitch, W. and Margoliash, E. (1967) Science 155, 279-284.
- (107) Ferguson-Miller, S., Brautigan, D.L. and Margoliash, E.
(1978) J. Biol. Chem. 253, 149-159.
- (108) Sone, N., Ikeba, K. and Kagawa, Y. (1979) FEBS Lett. 97,
61-64.
- (109) Weiss, H. (1976) Biochim. Biophys. Acta 456, 291-313.
- (110) Tzagoloff, A. and Meagher, P. (1972) J. Biol. Chem. 247,
594-603.
- (111) Jackl, G. and Sebald, W. (1975) Eur. J. Biochem. 54, 97-106.
- (112) Michel, R., Wachter, E. and Sebald, W. (1979) FEBS Lett.
101, 373-376.
- (113) Turner, G., Imam, G. and Küntzel, H. (1979) ' Eur. J. Biochem. 97, 565-571.
- (114) Dianoux, A.C., Bof, M. and Vignais, P.V. (1978)
Eur. J. Biochem. 88, 69-77.
- (115) Sala, F. and Küntzel, H. (1970) Eur. J. Biochem. 15,
280-286.
- (116) Sigrist-Nelson, K., Sigrist, H. and Azzi, A. (1978)
Eur. J. Biochem. 92, 9-14.
- (117) Riccio, P., Schägger, H., Engel, W.D. and von Jagow, G.
(1977) Biochim. Biophys. Acta 459, 250-262.
- (118) Johansson, B.C., Baltscheffsky, M. Baltscheffsky, H.,
Baccarini-Melandri, A. and Melandri, B.A. (1973)
Eur. J. Biochem. 40, 109-117.
- (119) Capaldi, R.A. and Vanderkoi, G. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 69, 930-932.

- | | |
|-------------------------------|--|
| 12.4.1949 | geboren in Karlsruhe als jüngstes von vier Kindern
Eltern: Martin Graf, Metzgermeister
Lina, geb. Schneider |
| April 1956-
April 1960 | Besuch der Grundschule in der Karlsruher Hebel-Schule |
| April 1960-
Juli 1968 | Besuch des humanistischen Gymnasiums in Karlsruhe mit dem Abitur als Abschluß |
| August 1966-
August 1967 | Aufenthalt in Hereford, Texas, im Rahmen eines Austauschprogramms mit Besuch und Abschluß der High School |
| Juli 1968-
Dezember 1969 | Ableistung des Grundwehrdienstes |
| Oktober 1969-
März 1972 | Studium an der Universität Freiburg in den Fachrichtungen Biologie/Chemie |
| ab April 1972 | Fortsetzung des Hochschulstudiums an der Universität München |
| Oktober 1974 | Diplom-Hauptprüfung |
| 31. Okt. 1974 | Heirat mit Gertraud Koller, Diplombiologin |
| Oktober 1974-
Oktober 1975 | Durchführung der Diplomarbeit über die Oberflächenstruktur der Cytochromoxidase in Mitochondrien aus Neurospora crassa unter Leitung von Prof. Dr. Dr.h.c. Theodor Bücher und Priv.-Doz. Dr. Walter Sebald am Institut für Physiologische Chemie |

1. Juni 1975 Geburt unseres Sohnes Nicolas
- Oktober 1975-
August 1978 Durchführung der vorliegenden Doktor-
arbeit ebenfalls am Institut für Physio-
logische Chemie
22. Dez. 1976 Geburt unserer Tochter Stephanie

